



Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica

Facultad de Farmacia

**Síntesis de Polímeros Sensibles al Medio para Aplicaciones
Biomédicas y Farmacéuticas**

Memoria presentada por la Licenciada Lucía
Romero Azogil para optar al Grado de Doctor.
Sevilla, 2018



Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica

Facultad de Farmacia

**Síntesis de Polímeros Sensibles al Medio para Aplicaciones
Biomédicas y Farmacéuticas**

VºBº La Directora de la Tesis

VºBº La Directora de la Tesis

Prof. M^a de Gracia García Martín
Catedrática de la Universidad de Sevilla
Dpto. Química Orgánica y Farmacéutica
Facultad de Farmacia

Prof. Elena M^a Benito Hernández
Profesora Contratada Doctora
Dpto. Química Orgánica y Farmacéutica
Facultad de Farmacia

CAPÍTULO 1: Introducción y antecedentes. Objetivos	3
1.1 Introducción y antecedentes	3
1.1.1 Sistemas inteligentes de transporte y liberación controlada de fármacos	3
1.1.2 Vectores no víricos basados en polímeros para terapia génica	10
1.1.3 Poliuretanos funcionalizados	18
1.1.4 Polimersomas	25
1.1.5 Politriazoles funcionalizados	30
1.1.6 Reversible Addition-Fragmentation chain Transfer mediated Polymerisation-Induced Self-Assembly of Hydroxylated Block Copolymer Nanoparticles	38
1.1.6A Polymerisation Mechanisms	38
1.1.6B Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer Polymerisation (RAFT Polymerisation)	39
1.1.6C Polymerisation-Induced Self-Assembly (PISA)	44
1.1.6D Thermoresponsive Diblock Copolymer Worm Gels	49
1.2 Objetivos	55
1.2.1 Proyecto desarrollado en la Universidad de Sevilla	55
1.2.2 Project Aims in the University of Sheffield	56
CAPÍTULO 2: Materiales y métodos	59

CAPÍTULO 3: Poliuretanos funcionalizados	75
3.1 Homo- y copoliuretanos	75
3.1.1 Síntesis de monómeros	75
3.1.2 Síntesis y caracterización estructural de homo- y copoliuretanos	77
3.1.3 Estudios de higroscopicidad	85
3.1.4 Propiedades térmicas	87
3.1.5 Estudios de degradabilidad	96
3.1.5A Degradabilidad mediada por glutatión	96
3.1.5B Degradación hidrolítica	100
3.1.6 Estudios de liberación controlada de fármacos	105
3.1.7 Parte experimental	109
3.1.7A Monómeros	109
3.1.7B Poliuretanos	115
3.1.7B1 Procedimiento general para la síntesis de homo- y copoliuretanos	115
3.1.7B2 Datos espectroscópicos de poliuretanos	115
3.2 Poliuretanos de bloque	126
3.2.1 Síntesis y caracterización estructural	126
3.2.2 Propiedades térmicas	128
3.2.3 Estudios de formación de polymersomas	130
3.2.4 Estudios de liberación de fármacos	132

3.2.5 Parte experimental	134
3.2.5A Procedimiento general para la síntesis coPU mPEGilados	134
3.2.5B Caracterización espectroscópica de los coPU mPEGilados	135
3.3 Poliuretanos catiónicos	137
3.3.1 Síntesis de monómeros	137
3.3.2 Síntesis y caracterización estructural	138
3.3.3 Propiedades térmicas	141
3.3.4 Estudio de interacciones poliuretano-ADN	143
3.3.5 Estudios de viabilidad celular	146
3.3.6 Parte experimental	148
3.3.6A Monómeros	148
3.3.6B Poliuretanos	152
CHAPTER 4: Functionalized polytriazoles	161
4.1 Synthesis of monomers	161
4.2 Synthesis and structural characterization of polytriazoles	162
4.2.1 Cationic poly(amido triazoles) and their <i>N</i> -Boc-protected precursors	164
4.2.1A <i>N</i> -protected poly(amido triazoles)	164
4.2.1B Cationic poly(amido triazoles)	165

4.2.2 Non-cationic poly(ester triazoles)	168
4.3 Thermal properties	174
4.3.1 Cationic poly(amido triazoles) and their precursors	174
4.3.2 Non cationic poly(ester triazoles)	176
4.4 Biological studies of cationic poly(amido triazoles)	179
4.4.1 Size and zeta potentials	179
4.4.2 <i>In vitro</i> transfection biology	182
4.4.3 Citotoxicity studies	185
4.5 Experimental section	187
4.5.1 Monomers	187
4.5.2 Politriazoles	195
4.5.2A General procedure for the synthesis of polytriazoles	195
4.5.2B General procedure for the removal of <i>N</i> -Boc protecting group of polytriazoles	196
4.5.2C General procedure for the removal of the <i>O</i> -isopropylidene group of polytriazoles	196
4.5.2D General procedure for <i>O</i> -deacetylation of polytriazoles	196
4.5.2E Spectroscopic data of polytriazoles	197
4.5.2E1 Cationic poly(amido triazoles) and their precursors	197
4.5.2E2 DPL-based poly(ester triazoles)	202
4.5.2E3 DPN-based poly(ester triazoles)	207

4.5.2E4 DT-based poly(ester triazoles)	208
CHAPTER 5: RAFT mediated PISA of hydroxylated block copolymer nanoparticles	213
5.1 Synthesis of the RAFT Agents	213
5.1.1 Synthesis of PETTC RAFT Agent	213
5.1.2 Synthesis of MePETTC RAFT Agent	214
5.2 Synthesis of Macromolecular-Chain Transfer Agents	215
5.2.1 Synthesis of poly(glycerol monomethacrylate) macro-CTA by RAFT Solution Polymerisation	215
5.2.2 Synthesis of Poly(ethylene glycol) Macro-Chain Transfer Agents	218
5.3 Synthesis of [(1-<i>n</i>) PGMA₅₉ + <i>n</i> PEG₄₅]-PHPMA_{<i>y</i>} Diblock Copolymer Nanoparticles via RAFT Aqueous Dispersion Polymerization of HPMA	221
5.4 Synthesis of [(1-<i>n</i>) PGMA₅₉ + <i>n</i> PEG₁₁₃]-PHPMA_{<i>y</i>} Diblock Copolymer Nanoparticles via RAFT Aqueous Dispersion Polymerization of HPMA	227
5.5 Experimental section	233
5.5.1 Synthesis of RAFT Agents	233
5.5.2 Synthesis of Macro-Chain Transfer Agents	236
5.5.3 Synthesis of [(1-<i>n</i>) PGMA₅₉ + <i>n</i> PEG₄₅]-PHPMA_{<i>y</i>} and [(1-<i>n</i>) PGMA₅₉ + <i>n</i> PEG₁₁₃]-PHPMA_{<i>y</i>} Diblock Copolymer Nanoparticles via RAFT Aqueous Dispersion Polymerisation of HPMA	239

Conclusiones	247
Bibliografía	253
References for Chapter 5	271
Anexos	279
Abreviaturas y acrónimos	279
Apéndice de espectros	287

CAPÍTULO

1

Introducción y antecedentes

Objetivos

1.1 Introducción y antecedentes

1.1.1 Sistemas inteligentes de transporte y liberación controlada de fármacos

Una gran cantidad de compuestos presentan actividad terapéutica reconocida, sin embargo, solamente algunos de ellos han encontrado utilidad clínica como fármacos para el tratamiento de determinadas enfermedades. Esto se debe a que la actividad terapéutica que muchos de estos compuestos presentan *in vivo* suele ser inferior a la encontrada en los estudios *in vitro* preliminares. La causa de la reducción de la actividad terapéutica es, en muchos casos, la baja biodisponibilidad, es decir la extensión y velocidad con las que el principio activo o fármaco en cuestión alcanza las dianas terapéuticas en el organismo. En algunos casos de administración por vía sistémica, la concentración en plasma puede encontrarse incluso por debajo de los niveles de efectividad, requiriéndose la administración de repetidas dosis. Es por lo que se han desarrollado nuevas formas de liberación controlada que presentan ventajas de pautas posológicas más cómodas, con menor número de tomas/día o de otro tipo, como la rapidez de acción o liberación específica en una diana determinada, por ejemplo: comprimidos osmóticos, comprimidos matriciales, sistemas de liberación colónica, entre otros.

Un sistema de liberación controlada de fármacos (SLC) consiste en incorporar el agente terapéutico a un compuesto de naturaleza polimérica, de manera que aquél se vaya liberando de una manera predeterminada. Dependiendo de la formulación farmacéutica y de la aplicación requerida, el tiempo de liberación oscila entre unas horas hasta un mes o incluso varios años. De esta manera los SLC permiten mejorar la biodisponibilidad de los fármacos previniendo su degradación prematura, controlando la velocidad de liberación, disminuyendo los efectos secundarios y dirigiéndolos hacia las

dianas terapéuticas. El diseño y aplicación de sistemas de dosificación controlada y liberación de fármacos en órganos específicos son en la actualidad los aspectos de mayor relevancia en el desarrollo de nuevas formas de medicación.

La FDA (Food and Drug Administration) aprobó en 1990 el primer SLC, el “Liposomal amphotericin B”, y desde entonces se han comercializado SLC para el tratamiento de enfermedades como el cáncer, infecciones bacterianas y fúngicas, o enfermedades degenerativas musculares (Zhang *et al.*, 2013), siendo millones los pacientes que actualmente se benefician de este tipo de medicamentos. Como consecuencia, se ha producido un cambio económico relacionado con el desarrollo de nuevos fármacos. El coste y tiempo promedios requeridos para desarrollar un SLC es aproximadamente de 20-50 millones de dólares (USD) y 3-4 años, que es significativamente menor que para el desarrollo de un nuevo fármaco, aproximadamente 500 millones USD y 10 años.

Las propiedades físicas y químicas de los SLC son decisivas para producir sistemas “inteligentes” que regulen específicamente la permeabilidad, la respuesta al medio, la funcionalidad superficial, la biodegradabilidad y los lugares de reconocimiento biomolecular. Desde el punto de vista de los materiales, la tendencia es obtener sistemas inteligentes, cargados con el principio activo o genes terapéuticos, que respondan a estímulos de ambiente y puedan liberar su carga en el lugar, el tiempo y a la velocidad deseada. El desarrollo de estos avanzados sistemas poliméricos de transporte y liberación de fármacos y material genético, capaces de responder a estímulos o señales fisiológicas en el ambiente intracelular —iones, proteínas, enzimas, cambios de pH, temperatura, condiciones redox— está suponiendo desde la pasada década un área de investigación preferente para aplicaciones tecnológicas y

biomédicas (Bajpai *et al.*, 2008; Mura *et al.*, 2013; Such *et al.*, 2015; Moghanjoughi *et al.*, 2016; Galbis *et al.*, 2017a).

Históricamente, polímeros tales como el caucho o el polietileno se usaron ampliamente como matrices para implantes y productos farmacéuticos. Con la creciente demanda de terapias efectivas y seguras, se han desarrollado polímeros biodegradables de base natural o sintética para determinadas aplicaciones biomédicas. Hasta el momento, se han conseguido grandes avances en la liberación controlada de agentes bioactivos mediante el empleo de sistemas poliméricos biodegradables basados en homo- y copolímeros que incluyen componentes hidrófobos e hidrófilos. Aunque en principio las combinaciones de materiales son ilimitadas, hay varios aspectos que restringen la aplicabilidad de muchos de ellos, como son la biocompatibilidad, la toxicidad del propio material y la de los subproductos derivados, la necesidad de eliminación de muchos de ellos vía quirúrgica y el coste económico de producción.

La búsqueda de polímeros polifuncionales biodegradables, que presenten baja toxicidad y fácil síntesis es uno de los objetivos más ampliamente perseguidos en este tipo de investigaciones y constituye uno de los pilares fundamentales de esta tesis. El término biomaterial engloba todos los materiales introducidos en los tejidos o fluidos corporales con propósitos terapéuticos específicos, ya sean para diagnóstico o preventivos. Estos materiales deben ser biocompatibles, es decir, no deben causar ningún efecto adverso significativo en el medio fisiológico tras la interacción con los tejidos y/o fluidos corporales y deben biodegradarse en componentes no tóxicos (Sáez *et al.*, 2002). Con el empleo de estos biomateriales se trata de eliminar o reducir en gran medida los efectos secundarios y conseguir una concentración terapéutica del fármaco estable en el organismo. Se busca alcanzar una cinética de orden cero, en la que la velocidad de liberación es

independiente del tiempo, sin fluctuaciones en la concentración del fármaco en el organismo, en comparación con los cambios intermitentes de concentración de fármaco que se obtienen con los sistemas de dosificación convencionales.

La funcionalización de las cadenas poliméricas aporta propiedades exclusivas adicionales a los correspondientes materiales para la administración de moléculas terapéuticas. Así se pueden provocar cambios estructurales en el SLC que den lugar a la liberación selectiva del fármaco. La Figura 1.1 representa un modelo de diseño de copolímeros de naturaleza anfifílica capaces de responder a estímulos en el ambiente intracelular (Wei *et al.*, 2013). Estos sistemas de administración basados en polímeros biodegradables se centran en potenciar las propiedades fisicoquímicas y la biodisponibilidad de los fármacos, especialmente aquellos con baja solubilidad y tiempos de vida media-cortas, como es el caso de la mayoría de los agentes antineoplásicos. Además, estos sistemas confieren una gran capacidad de encapsulación y un excelente control de liberación.

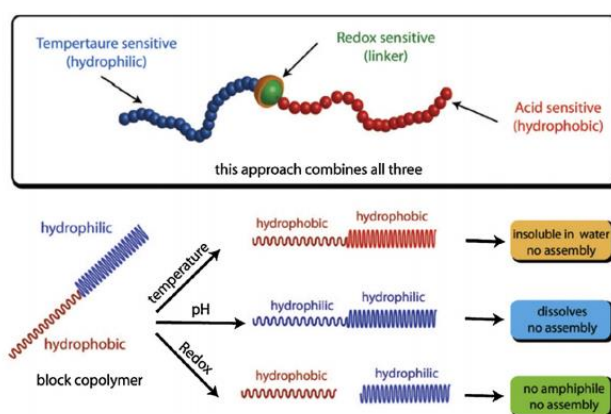


Figura 1.1. Diseño de copolímeros dibloque anfifílicos que responden a estímulos (temperatura, pH, condiciones redox).

De las posibles aplicaciones de estos sistemas, la liberación controlada de fármacos a nivel gastrointestinal es, aún hoy en día, un reto muy importante debido a la variedad de enfermedades locales existentes, como la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn, la amebiosis o el cáncer de colon, entre otras. En el caso particular del colon, se sabe que, determinados péptidos y proteínas son absorbidos y dada la menor variedad de enzimas digestivas, la actividad proteolítica de la mucosa colónica es mucho menor que la observada a otros niveles intestinales. Un buen sistema de liberación colónica de fármacos debe proteger al fármaco del nivel estomacal y de los niveles intestinales superiores, es decir, que no debe ser disuelto ni degradado a lo largo del tracto gastrointestinal, para ser liberado y absorbido a nivel de colon. Como consecuencia de la mayor capacidad de absorción de agua observada en este lugar, los contenidos colónicos son muy viscosos y la absorción de los fármacos a través de la membrana es baja. En el colon humano existen alrededor de 400 tipos diferentes de bacterias y se calcula una población aproximada de 1000 bacterias por gramo de contenido colónico (Philip y Philip, 2010). Los principales procesos metabólicos que tienen lugar a este nivel son de reducción (nitroreductasas, azoreductasas, *N*-óxidoreductasas, sulfóxidoreductasas e hidrogenasas) y de hidrólisis (esterasas, amidasas, glicosidasas, glucuronoidasas y sulfatasas).

Los polímeros redox son macromoléculas electroactivas que contienen grupos funcionales, como el grupo disulfuro, sensibles a los medios reductores [Figura 1.2 (Casado *et al.*, 2016)]. En el caso de materiales poliméricos para SLC a nivel intestinal, especialmente a nivel colónico, la presencia de grupos disulfuro en las cadenas poliméricas asegura la biodegradación de estos materiales con la consiguiente liberación del fármaco (Yang *et al.*, 2016).

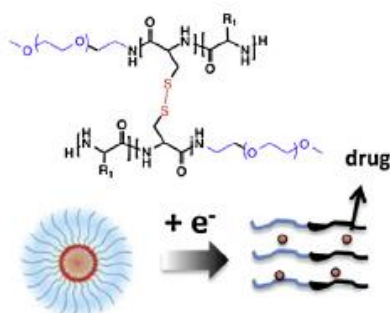


Figura 1.2. Representación esquemática de un polímero redox con aplicación como sistema de liberación controlada de fármacos.

En la actualidad, la terapia contra el cáncer exige SLC de fármacos eficientes y de baja toxicidad, que puedan alcanzar específicamente las dianas terapéuticas como respuesta a estímulos endógenos, como el microambiente hipóxico de las células tumorales. El grupo disulfuro es uno de los grupos funcionales más habituales presentes en los polímeros redox para aplicaciones biomédicas porque es reducido con facilidad en el ambiente hipóxico de las células tumorales. El grupo disulfuro se reduce a grupos tiol por acción del tripéptido natural glutatión (GSH) [Figura 1.3 (De Paz *et al.*, 2010)] cuya concentración en las células tumorales es cuatro veces superior que en las células sanas (Wang *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016). El mecanismo de liberación basado en el intercambio tiol-disulfuro mediado por GSH reduce los enlaces disulfuro en el polímero, permitiendo la salida de del fármaco (Such *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016). Cabe señalar que los enlaces disulfuro no solamente se reducen en el ambiente intracelular sino también en determinados compartimentos extracelulares, aunque mucho más lentamente que en el citoplasma.

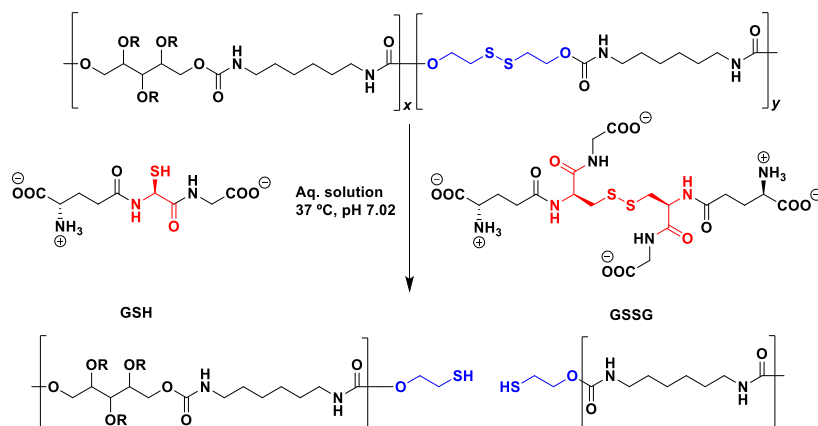


Figura 1.3. Degradación mediada por glutatión de poliuretanos conteniendo grupos disulfuro.

Dependiendo de las aplicaciones de estos materiales, los grupos disulfuro pueden formar parte de las cadenas poliméricas o bien pueden utilizarse en posiciones de entrecruzamiento entre tales cadenas. Por ejemplo, cuando se requiere una rápida biodegradabilidad, estos grupos deben formar parte de las cadenas principales en una elevada concentración. En el segundo caso, con la reducción de los grupos disulfuro se pierde la estructura tridimensional del sistema. Sin embargo, se ha demostrado que no siempre la capacidad de reducción de los sistemas conteniendo grupos disulfuro se debe exclusivamente a la concentración de éstos en el material polimérico, sino que hay otros factores que pueden facilitar la biodegradación como son la naturaleza amorfa, la cristalinidad y la hidrofilia de estos materiales (De Paz *et al.*, 2010; Ferris *et al.*, 2010). Adicionalmente, la presencia en las cadenas poliméricas de unidades estructurales derivadas de carbohidratos mejora tanto la biodegradabilidad como la biocompatibilidad de los materiales correspondientes (Galbis y García-Martín, 2010; Galbis *et al.*, 2016). Las unidades estructurales que aporten hidrofilia a los correspondientes materiales, aseguran la biodegradación de los mismos en ambientes

reductores hipóxicos. La hidrofilia puede ser modulada por la presencia de unidades estructurales derivadas de carbohidratos, las cuales además garantizarán la menor toxicidad de estos materiales. Los polímeros sintéticos basados en carbohidratos “*Sweet Polymers*” tienen un papel cada vez más determinante como materiales biodegradables de aplicación en biomedicina (Mees *et al.*, 2016).

1.1.2 Vectores no víricos basados en polímeros para terapia génica

El auge en los últimos años de áreas como la genómica y la biología han conseguido la identificación de nuevas dianas terapéuticas, lo que permite orientar cada vez más la investigación de agentes terapéuticos basados en ácidos nucleicos, péptidos y proteínas. La terapia génica ha supuesto una revolución en la manera de abordar el tratamiento de las enfermedades genéticas, puesto que ha abierto un nuevo horizonte para curar enfermedades para las que hasta el momento solo existían tratamientos orientados a paliar sus síntomas. Esta terapia incluye el conjunto de técnicas que permiten vehiculizar secuencias de ADN o de ARN al interior de células diana, con objeto de modular la expresión de determinadas proteínas que se encuentran alteradas, revirtiendo así el trastorno biológico que ello produce.

Esta práctica clínica presenta un gran potencial en el tratamiento de una variedad de desórdenes adquiridos y genéticos tales como el cáncer, hemofilia, fibrosis quística, infecciones y trastornos cardiovasculares (Xu y Yang, 2011). En el caso de desórdenes hereditarios, la introducción de una copia normal del gen afectado restaura el funcionamiento correcto de la célula. Para el tratamiento de desórdenes adquiridos, como el cáncer o enfermedades infecciosas, las estrategias eficaces implican no solo la

introducción de un gen terapéutico, sino que también se pueda silenciar un gen anormal cuya expresión está aumentada en las células afectadas.

La primera experiencia clínica con este tipo de terapia se llevó a cabo en 1990, transfiriéndose un gen resistente a los linfocitos de un paciente (Blaese *et al.*, 1995). Desde entonces la terapia génica ha sido aplicada en casos de inmunodeficiencia combinada severa (ICS), β -talasemia y otras muchas enfermedades (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2000; Cavazzana-Calvo *et al.*, 2010; Sheridan, 2011). Sin embargo, el optimismo inicial se fue diluyendo debido a los problemas de seguridad acaecidos. La muerte de algunos voluntarios se asoció a problemas de toxicidad de los transportadores de naturaleza vírica empleados (Branca, 2005) y también fueron diagnosticados algunos casos de leucemias en los pacientes sometidos a esta terapia contra la ICS (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2008). Por ello, a pesar de los éxitos descritos con terapia génica en los ensayos clínicos preliminares, los riesgos empezaron a limitar en alto grado su aplicabilidad. De un lado, los vectores víricos son potencialmente capaces de recombinarse con otros virus susceptibles de replicación (Nayak y Herzog, 2010). Por otro lado, pueden inducir respuestas inmunogénicas o inflamatorias y, eventualmente, dar lugar a inserciones indeseadas en el genoma hospedador (Rosenberg y Schechter, 2000; Gansbacher, 2003; Nayak y Herzog, 2010).

En la era de los materiales sintéticos y de la nanotecnología, los vectores no víricos se presentan actualmente como la solución a los problemas reseñados anteriormente. Tales vehículos se pueden diseñar y construir a medida, teniendo en cuenta aspectos esenciales como la biocompatibilidad, la biodegradabilidad, la capacidad para formar complejos con los ácidos nucleicos, el paso a través de membranas y la capacidad de dirigirse a las dianas terapéuticas. Estos vectores pueden ser naturales o sintéticos, generalmente polímeros catiónicos o nanomateriales tales como

nanopartículas organometálicas, nanopartículas inorgánicas y dendrímeros.

Muchos de los vectores de naturaleza no viral desarrollados en terapia génica están basados en moléculas catiónicas que se unen a un ácido nucleico (plásmido u oligonucleótido) mediante interacciones electrostáticas formando complejos denominados *poliplejos*.

Los vectores no víricos aún no han podido superar por completo las barreras requeridas para la aplicación en clínica (Jones *et al.*, 2015), lo que ha alentado al desarrollo de nuevas alternativas de baja citotoxicidad e inmunogenicidad y elevada eficacia en la administración de genes. Además, el proceso de unión, transferencia y expresión del material genético no ha sido totalmente elucidado. Por este motivo, se han realizado importantes esfuerzos en este tipo de caracterización, con el objetivo de que estos parámetros puedan ser de utilidad a la hora de predecir y establecer las condiciones en las que la transfección sea óptima. Las características físico-químicas de los poliplejos (estructura, tamaño, carga o su capacidad de interacción con biomoléculas) dependen en gran medida de la naturaleza del polímero (estructura, peso molecular, densidad de carga, etc.). Se piensa que la naturaleza del complejo determina en gran parte la eficacia de transfección, y que la formación de complejos con el ADN condensado facilita la entrada del material genético en las células (Figura 1.4).

Los lípidos y los polímeros catiónicos interactúan electrostáticamente con los ácidos nucleicos, neutralizándolos y facilitando así la compactación en nanopartículas coloidales —lipoplejos y poliplejos, respectivamente—, además presentan estabilidad metabólica aumentada y permeabilidad a las membranas.

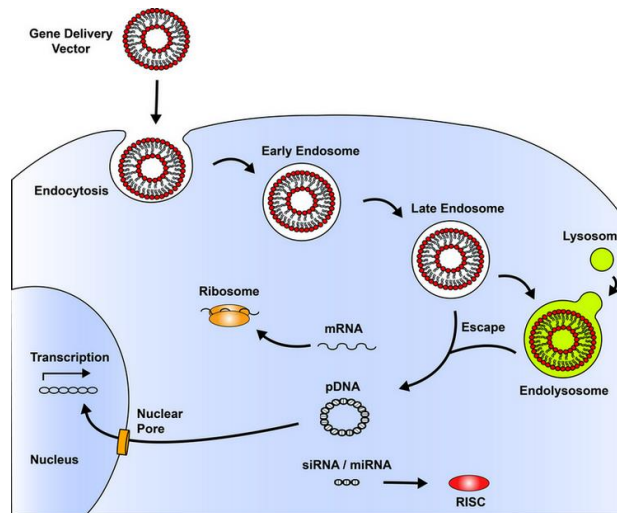


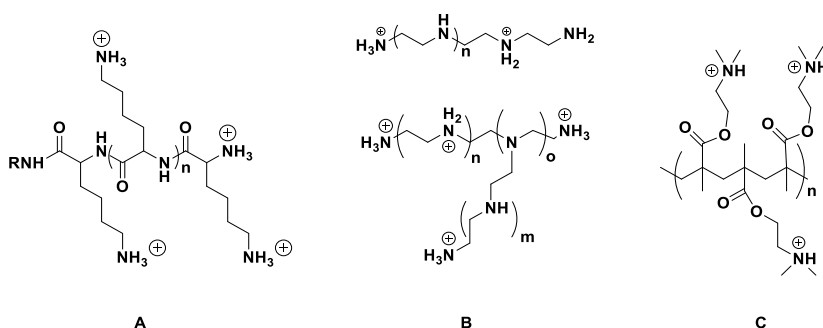
Figura 1.4. Representación esquemática del mecanismo de endocitosis en terapia génica.

Los nuevos avances en química de polímeros permiten disponer de vectores catiónicos con formas, composiciones y arquitecturas variadas, cuya eficacia como sistemas de liberación de material genético está siendo mejorada (Xu y Yang, 2011). Los polímeros catiónicos más estudiados son poli(etilénimina) (PEI) y poli-L-lisina (PLL) (Esquema 1.1) tanto *in vitro* como *in vivo* (Mintzer y Simanek, 2009). La elevada expresión génica de PEI se atribuye a su elevado efecto protónico, ya que actúa como “esponja de protones” dentro del endosoma para evitar el tráfico y la degradación lisosomal, eficaz complejación de ADN y fácil liberación de éste. Las innumerables modificaciones llevadas a cabo han ayudado a mejorar y comprender sus propiedades fisicoquímicas.

Los poliplejos formados a partir de PLL se internalizan eficazmente en distintas líneas celulares, pero con niveles de expresión moderados debido al alto grado de protonación de sus grupos amino a pH fisiológico, al elevado tráfico lisosomal y, por consiguiente, a la lenta liberación del endosoma (Akinc

y Langer, 2002). Determinadas modificaciones estructurales de la PLL mediante la introducción de grupos imidazol (Putnam *et al.*, 2001) o la construcción de dendrímeros (Ohsaki *et al.*, 2002) han contribuido a mejorar el perfil de toxicidad.

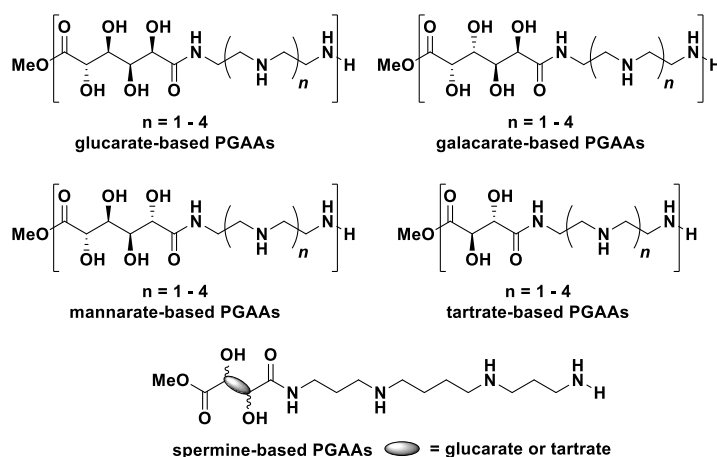
Debido a su carga inherente, el poli[metacrilato de 2-(dimetilamino)etilo] (PDMAEMA) ha sido también considerado un buen candidato para desarrollar vectores sintéticos de genes (Esquema 1.1). Recientemente, se ha utilizado para la administración de genes y fármacos antineoplásicos a células cancerosas resistentes a fármacos con resultados alentadores para el tratamiento del cáncer (Wang *et al.*, 2017a).



Esquema 1.1. Polímeros catiónicos utilizados como vectores no víricos. A) Poli-L-lisina (PLL); B) Polietilenimina (PEI) lineal y ramificada; C) Poli[metacrilato de 2-(dimetilamino)etilo] (PDMAEMA).

Sin embargo, la elevada toxicidad de los polímeros catiónicos sintéticos, sus interacciones no específicas con células y proteínas tanto *in vitro* como *in vivo* y las respuestas inmunológicas no esperadas han desviado la atención hacia el desarrollo de análogos biocompatibles. Por esta razón se inició el estudio de polímeros basados en polisacáridos naturales no tóxicos, aunque

presentaron una baja expresión génica. Reineke y Guan, (Reineke, 2006; Metzke *et al.*, 2005) independientemente, prepararon una variedad de poliglicoamidoaminas (PGAAs) imitando la estructura lineal de PEI (Esquema 1.2) y de PLL con variaciones estructurales sistemáticas en la estequiometría (Liu *et al.*, 2004). Los residuos de oligoamina proporcionan una cadena principal catiónica que facilita una fuerte unión al ADN, permitiendo una eficaz compactación, captación celular y suministro de material genético. Estos transportadores mostraron elevados niveles de expresión genética frente a varias líneas celulares, como HeLa, H9c2(2-1), HepG2 y BHK-21. La eficiencia de transfección fue comparable con otros derivados de PEI pero con perfiles de toxicidad mejorados.



Esquema 1.2. Poliglicoamidoaminas (PGAA) del tipo PEI.

Posteriormente, se han desarrollado polímeros catiónicos biodegradables y biocompatibles no tóxicos basados en carbohidratos, en los que la liberación de material genético está facilitada por la reducción de los puentes disulfuro en el citosol (Ahmed y Narain, 2013).

Los glicoconjugados, carbohidratos unidos por enlaces covalentes a una porción no azucarada, pueden ser reconocidos específicamente por los receptores de las membranas celulares y otros receptores intracelulares (Bies *et al.*, 2004). En este sentido, se han desarrollado glicopolímeros catiónicos tipo peine mediante la técnica de polimerización radicalaria RAFT (Reversible Addition–Fragmentation chain Transfer) para ser evaluados como transportadores de genes [Figura 1.5 (Ahmed y Narain, 2011)]. Las propiedades de estos polímeros fueron explicadas en base a la arquitectura química, el peso molecular, la hidrofilia y el contenido en carbohidratos, afectando en todos los casos a la toxicidad, a la capacidad de condensación del ADN y a la eficacia de la administración. De nuevo, estos materiales mostraron una expresión génica similar a PEI, pero con perfiles de toxicidad mejorados. Se determinó la composición crítica del segmento derivado de carbohidrato para asegurar una baja toxicidad, pero un incremento en la proporción de dicho segmento resultó en una disminución de la eficiencia de transfección de estos transportadores.

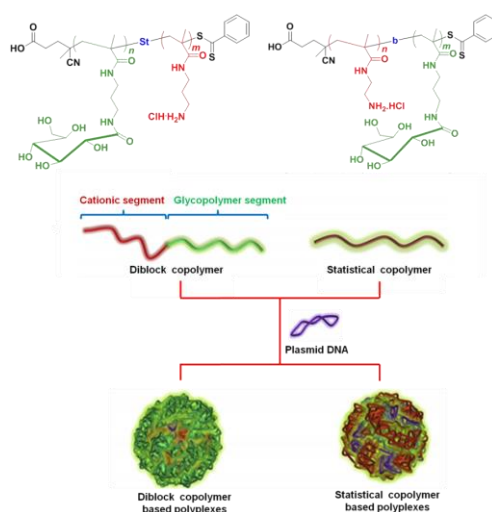


Figura 1.5. Glicopolímeros catiónicos empleados como vectores en la formación de poliplexos para transfección de ADN.

Los derivados de galactosa (o lactosa), manosa y glucosa también han sido ampliamente estudiados como glicoligandos debido a la selectividad que presentan por las células de los sistemas hepático e immune. Determinados policarbonatos dibloque catiónicos funcionalizados con unidades derivadas de D-galactosa y D-glucosa evidenciaron un gran potencial para la administración selectiva de genes terapéuticos dirigidos a los hepatocitos (Ong *et al.*, 2013). El transportador demostró excelentes propiedades para vehiculizar material genético en el tratamiento de la hepatitis de manera segura, eficiente y con una citotoxicidad mínima en la línea celular ensayada.

Actualmente, el quitosano es uno de los polisacáridos más estudiados como vector no vírico, aunque otros como el dextrano o el Schizophyllan (un polisacárido producido por el hongo *Schizophyllum commune*) también han demostrado propiedades muy interesantes. El quitosano tiene una estructura similar a los glicosaminoglicanos naturales. Su biocompatibilidad, baja toxicidad y sus propiedades no antigénicas hacen de él otro material atractivo para aplicaciones de terapia génica. Sin embargo, es necesario disponer de metodologías apropiadas que permitan llevar a cabo las modificaciones estructurales necesarias para poder controlar los pesos moleculares, la composición, la distribución de cargas y la arquitectura molecular. En este sentido, se han llevado a cabo modificaciones del quitosano con residuos de galactosa para su estudio como portadores de genes, observándose un aumento significativo en la eficacia de la transfección para la línea celular ensayada con el transportador galactosilado (Satoh *et al.*, 2007). También se han llevado a cabo modificaciones de polímeros como el poli(etilenglicol) (PEG) introduciendo fragmentos iónicos (Guo *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2016), y también a partir de polímeros naturales como péptidos y lípidos con objeto de aumentar la estabilidad de los poliplejos y disminuir la toxicidad.

A medida que se van conociendo los procesos de auto-ensamblaje implicados en la formación de agregados entre los ácidos nucleicos y los vectores sintéticos, la gama de biomateriales diseñados para este propósito se amplía. Algunas de las barreras conocidas son la baja absorción celular, la difícil eliminación endosomal, así como la baja transferencia de ADN de los poliplejos en el núcleo. Por ello, la síntesis de vectores estables y eficaces es aún hoy un reto debido, sobre todo, al desconocimiento sobre posibles interacciones con las células a nivel molecular y los efectos secundarios que puedan causar en los pacientes.

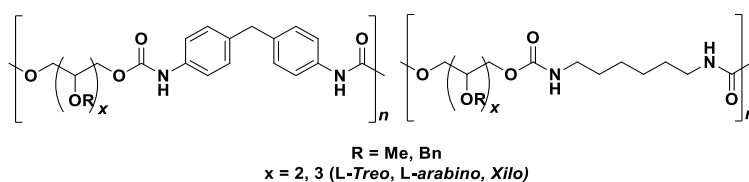
1.1.3 Poliuretanos funcionalizados

La utilización de poliuretanos (PU) como biomateriales es cada vez más extensa debido a sus excelentes propiedades, entre las que destacan su baja toxicidad, biodegradabilidad, biocompatibilidad y versatilidad funcional (Zhang *et al.*, 2008). Se han empleado en liberación controlada de fármacos, fabricación de implantes y estructuras de ingeniería tisular, derivaciones arterio-ventriculares, injertos vasculares, válvulas, dispositivos e instrumentación biomédica y recubrimientos dermatológicos hemocompatibles para catéteres y marcapasos.

Generalmente los grupos uretano se obtienen a partir de un isocianato ($R-N=C=O$) y un alcohol ($R'-OH$). El uso de isocianatos para la síntesis de PU se debe a su alta reactividad frente a grupos nucleófilos, como los grupos hidroxilo de los dioles (Dombrow, 1957). Nuestro grupo de investigación “Carbohidratos y Polímeros” ha demostrado que los polímeros sintéticos basados en carbohidratos en general, y los PU en particular (Galbis y García-Martín, 2010; Galbis *et al.*, 2016; Galbis *et al.*, 2017b), garantizan la biocompatibilidad y biodegradabilidad de los materiales obtenidos (Ferris *et*

al., 2010; Begines *et al.*, 2012). La hidrofilia es un factor incuestionable al considerar la biodegradación de materiales poliméricos sintéticos en condiciones fisiológicas. Actualmente, los polímeros de elevada hidrofilia están siendo ampliamente estudiados para aplicaciones en forma de hidrogel (Nguyen y Alsberg, 2014; Koetting *et al.*, 2015) e ingeniería de tejidos para imitar la elasticidad de los tejidos blandos y regular el comportamiento celular durante la regeneración tisular (Chen *et al.*, 2015).

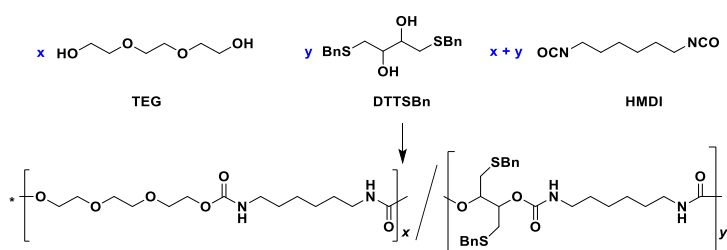
Entre los resultados más significativos de nuestro grupo de investigación sobre la síntesis y caracterización de una considerable variedad de PU, son destacables los ejemplos que se exponen a continuación (Esquemas 1.3-1.12). La presencia de grupos metoxilo en las unidades repetitivas de los PU mostrados en el Esquema 1.3 fue determinante en la hidrodegradabilidad de los mismos, siendo los derivados de pentitales, que contenían un mayor número de grupos metoxilo, los que se presentaron una mayor degradación (De Paz *et al.*, 2007; Marín y Muñoz-Guerra, 2008; Marín *et al.*, 2009; Ferris *et al.*, 2011).



Esquema 1.3. PU lineales a partir de alditoles metoxilados.

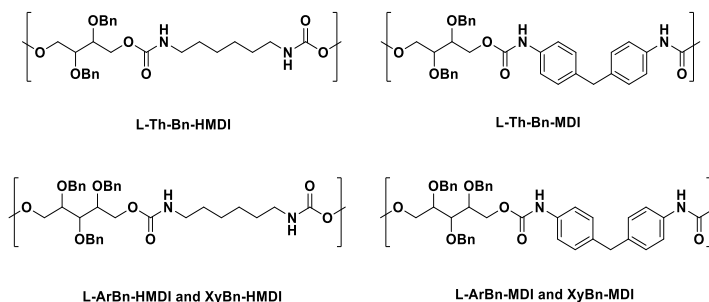
A partir de trietilenglicol (TEG) y derivados bencilados de ditiotreitól (DTT) se obtuvo una nueva serie de homo- y copoliuretanos con elevada hidrofilia que fueron sometidos a ensayos de degradación enzimática e hidrolítica a

diferentes pH y temperaturas [Esquema 1.4 (Ferris *et al.*, 2010)]. El pH del medio junto con la temperatura tuvo un marcado impacto en las tasas de degradación, observando la mayor caída de M_w a pH 8 y 70 °C. La degradación enzimática estuvo mediada por enzimas proteolíticas (papaína, α -quimiotripsina) y esterases (colesterol esterasa y lipasa). Fue la primera vez que se describió la hidrólisis del enlace uretano por la lipasa pancreática en poliuretanos.



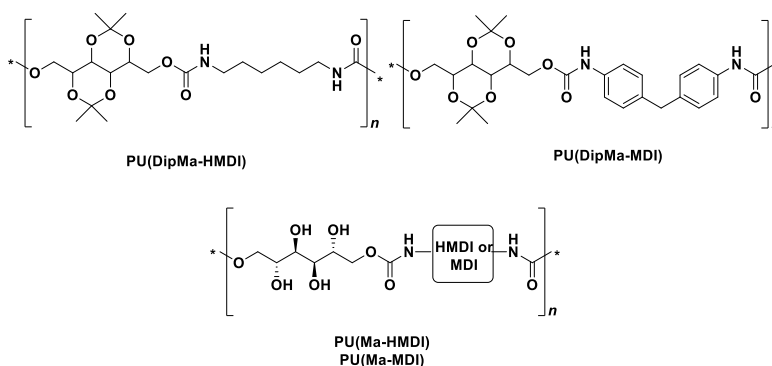
Esquema 1.4. PU basados en TEG y derivados bencilados de DTT.

Aprovechando la mayor reactividad de los hidroxilos primarios de los alditoles, se llevó a cabo la reacción directa de xilitol con diisocianatos (Begines *et al.*, 2011)] pero se observaron reacciones de entrecruzamiento incluso llevando a cabo las poliadiciones a temperaturas muy bajas. Después la investigación se orientó hacia la utilización de alditoles con los grupos hidroxilo secundarios protegidos con grupos protectores fácilmente eliminables, conducentes a la obtención de polihidroxiuretanos. Se llevó a cabo la síntesis de PU multihidroxisados a partir de alditoles con grupos hidroxilo secundarios protegidos como *O*-bencil éteres [Esquema 1.5 (Marín *et al.*, 2009). Sin embargo, el proceso de desprotección requirió condiciones de reacción muy drásticas, obteniéndose solamente desprotecciones parciales.



Esquema 1.5. PU lineales obtenidos a partir de alditos *O*-bencilados.

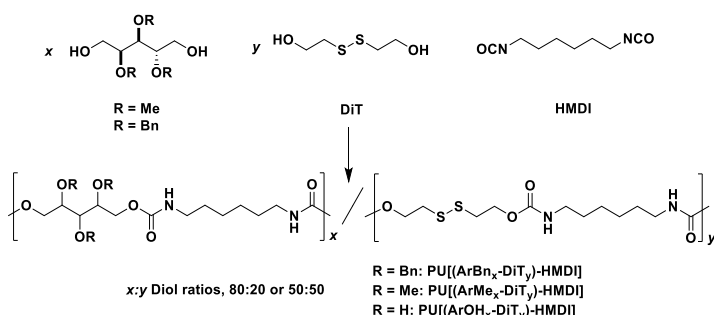
La hidrólisis de los grupos protectores presentes en PU lineales con unidades de di-*O*-isopropilidén-D-manitol condujo a PU hidroxilados con hidrofilia y degradabilidad mejoradas en comparación con los PU *O*-protegidos [Esquema 1.6 (Begines *et al.*, 2012).



Esquema 1.6. PU lineales a partir 2,4:3,5-di-*O*-isopropilidén-D-manitol.

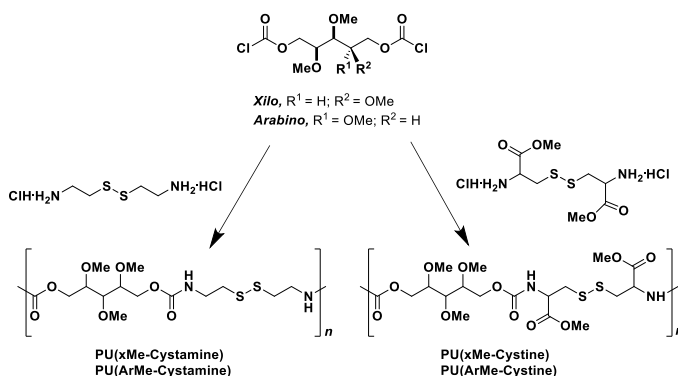
En la permanente búsqueda de la biodegradabilidad y biocompatibilidad, se sintetizaron copoliuretanos (coPU) a partir de L-arabinitol y 2,2'-ditioetanol (DiT) que, debido a la presencia de grupos disulfuro, se degradaron en

presencia del tripéptido glutatión bajo condiciones fisiológicas [Esquema 1.7 (De Paz *et al.*, 2010)].



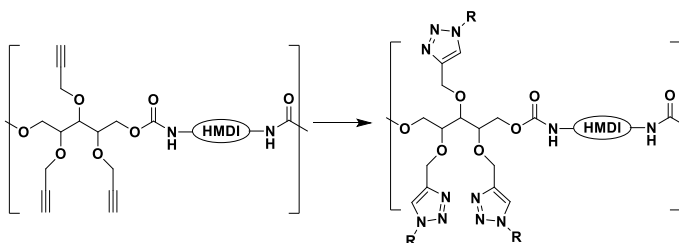
Esquema 1.7. CoPU degradables por glutatión.

Se han preparado otras series de PU lineales a partir de diaminas derivadas del aminoácido cistina con (bis)cloroformatos derivados de alditoles con configuraciones *L-arabino* o *xilo*. La biodegradabilidad de estos materiales fue considerablemente mejorada con la introducción de enlaces disulfuro en las cadenas poliméricas, lo que garantizó la degradación mediada por glutatión en condiciones fisiológicas [Esquema 1.8 (Begines *et al.*, 2015)].



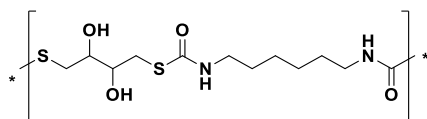
Esquema 1.8. Síntesis de PU lineales con configuraciones *L-arabino* y *xilo*.

También se sintetizaron coPU biodegradables de tipo peine (*comb-like*) con cadenas laterales dispuestas con una cierta regularidad a lo largo de la cadena principal [Esquema 1.9 (Begines *et al.*, 2016)]. La ruta sintética consistió en dos etapas: preparación de coPU con múltiples grupos propargilo y posterior derivatización mediante química “click”. La introducción de estas ramificaciones en las cadenas poliméricas permitió la obtención de una variedad de polímeros, cuyo balance hidrofílico/lipofílico ejerció un marcado impacto en la degradabilidad final de estos materiales.



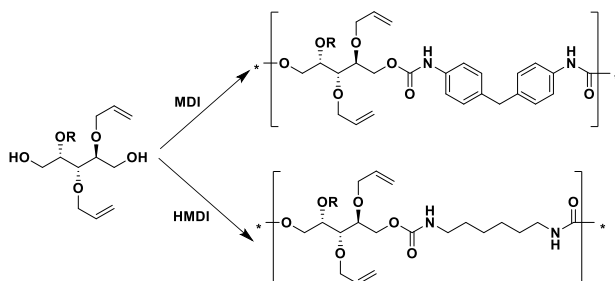
Esquema 1.9. Multipropargil PU y posterior derivatización mediante química “click”.

Por reacción de D,L-1,4-ditiotreitol (DTT) con HMDI en ausencia de catalizador, lo que es relevante para potenciales aplicaciones biomédicas [Esquema 1.10 (Campiñez *et al.*, 2015), se obtuvo un PU que fue usado como matriz para formulaciones de liberación modificada de fármacos, mostrando una importante disminución en la velocidad de liberación del fármaco modelo teofilina.



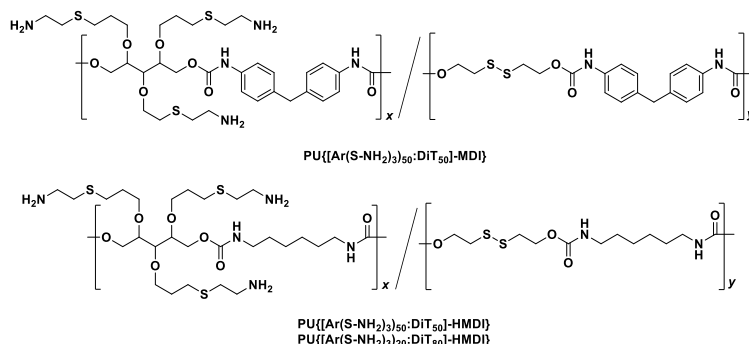
Esquema 1.10. PU lineal obtenido a partir de DTT.

Se sintetizaron PU a partir de di- y tri-*O*-alil-L-arabinitol (Esquema 1.11) y se llevó a cabo su derivatización mediante reacciones “click” de tipo tiol-eno. Así se obtuvieron materiales de diversa naturaleza (Ferris *et al.*, 2012).



Esquema 1.11. PU lineales funcionalizados con grupos alilo para reacciones de derivatización tiol-eno.

Algunos de estos polímeros fueron estudiados como matrices para sistemas de liberación controlada del fármaco anticanceroso metotrexato *in vitro*, presentando un excelente perfil de liberación a nivel de colon [Esquema 1.12 (Campiñez *et al.*, 2013; Ferris *et al.*, 2014)].



Esquema 1.12. PU lineales funcionalizados derivados de L-arabinitol.

1.1.4 Polimersomas

Como ya se ha mencionado, es posible mejorar la eficacia terapéutica de muchos fármacos mediante SLC de naturaleza polimérica. Durante los últimos años, nanopartículas poliméricas como micelas (estructura densa) y polimersomas (estructura hueca) (Figura 1.6) son los nanovehículos más estudiados para diagnóstico y farmacoterapia de numerosas enfermedades.

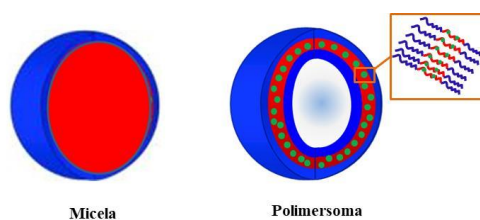


Figura 1.6. Tipos de nanopartículas.

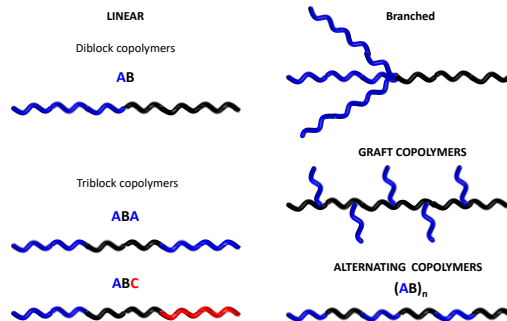
Conceptualmente, los polimersomas (PSM) son esferas huecas (vesículas) de tamaño coloidal compuestas por un núcleo acuoso rodeado por una

membrana bicapa polimérica. Se puede considerar que los PSM son los análogos sintéticos a los liposomas que se encuentran en las células vivas. Los PSM están constituidos por copolímeros de bloque anfifílicos que poseen la capacidad de autoensamblarse en medio acuoso, mediante procesos de inspiración biológica, dando lugar a partículas con tamaños comprendidos entre 20 y 200 nm (Tong y Cheng, 2007; Li y Huang, 2008).

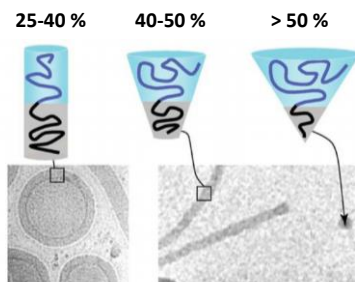
Los PSM han abierto muchas posibilidades en cuanto a aplicaciones de administración de fármacos se refiere, debido a que presentan elevada estabilidad coloidal, versatilidad química, propiedades de membrana, así como capacidad de acomodar una amplia gama de fármacos, tanto hidro- como liposolubles, y biomoléculas (Balasubramanian *et al.*, 2016). Los copolímeros anfifílicos di- o tri-bloque han sido los más estudiados para la formación de vesículas y en menor extensión los alternantes, los ramificados y los de injerto (Figura 1.7).

El espesor de la membrana de las vesículas poliméricas es superior al de los liposomas debido, en general, a los pesos moleculares más elevados de los copolímeros, lo que les confiere mayor robustez y estabilidad para aplicaciones fisiológicas avanzadas. Como los PSM se preparan a partir de polímeros anfifílicos, el espesor de la membrana bicapa puede modificarse ajustando el peso molecular de los bloques hidrófobos (Thambi *et al.*, 2016). Las funcionalidades responsables del transporte de fármacos son compartidas por los segmentos estructurales dentro del copolímero de bloque. La capa externa es responsable de las interacciones con los biocomponentes, lo que determina el comportamiento farmacocinético y la biodistribución del fármaco.

a)



b)



c)

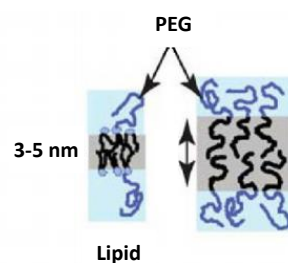


Figura 1.7. Polimersomas. a) Copolímeros; b) morfología; c) espesor de membrana.

Los PSM influyen sobre las propiedades de membrana y la capacidad de encapsulación de moléculas hidrófilas (cargadas dentro del núcleo acuoso), moléculas hidrófobas (cargadas dentro de la membrana bicapa) o una combinación de ambas, permitiendo así una acción terapéutica mayor que con el empleo de un solo fármaco. Aunque estas propiedades han colocado a los PSM a la vanguardia de las aplicaciones de administración de fármacos, estas formulaciones liberan rápidamente el principio activo en el sitio de destino. Debido a esto, la investigación se ha redirigido hacia el desarrollo de PSM que respondan a estímulos externos para controlar la liberación del fármaco (Palivan *et al.*, 2016). Recientemente se han desarrollado imitadores

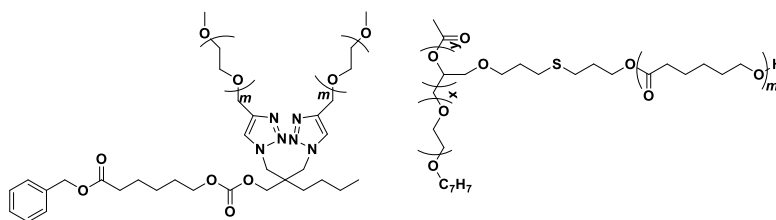
estructurales y funcionales de células eucarióticas basados en PSM capaces de responder a estímulos de entorno (Liu *et al.*, 2017; Hu *et al.*, 2017; Che *et al.*, 2018). Los PSM son también atractivos candidatos para terapia génica e ingeniería de tejidos (Thambi *et al.*, 2016).

El cáncer representa en la actualidad una de las principales causas de mortalidad y un gran desafío para la quimioterapia moderna. A diferencia de la radiación y la cirugía, que se centran en un área específica, los agentes antineoplásicos viajan por todo el cuerpo, por lo que pueden destruir células cancerosas extendidas desde el sitio primario de origen. En los tratamientos quimioterapéuticos actuales, un gran número de los fármacos empleados presentan baja solubilidad en agua (Narvekar *et al.*, 2014). En consecuencia, muchos de ellos deben reformularse usando altas concentraciones de agentes solubilizantes para su administración intravenosa, con el consiguiente aumento de la toxicidad y la aparición de efectos secundarios graves. Estudios recientes se han centrado en el microambiente del área tumoral, para el desarrollo de PSM sensibles a estímulos específicos de ese ambiente, como una estrategia para mejorar la quimioterapia (Thambi *et al.*, 2016).

Doxetacel y paclitaxel son potentes antineoplásicos que han demostrado excelentes resultados terapéuticos frente una amplia variedad de tumores, como el de mama, pulmón, ovario, hígado, vejiga, estómago, linfoma de Hodgkin, ciertos tipos de leucemias y otros tumores malignos. Sin embargo, estos fármacos presentan algunos inconvenientes fisicoquímicos, farmacocinéticos y farmacodinámicos, como son baja solubilidad en agua, tiempos de vida media variables, elevada unión a proteínas plasmáticas, además de múltiples efectos secundarios como neutropenia, neuropatías periféricas, vómitos, diarrea, alopecia, entre otros. Para la administración intravenosa de paclitaxel se requieren elevados volúmenes de tensioactivos con los consiguientes efectos adversos para el paciente, tales como reacciones

de hipersensibilidad, neurotoxicidad y nefrotoxicidad. Recientemente se han desarrollado nuevas vesículas poliméricas que han logrado un importante aumento de la solubilidad de paclitaxel para el tratamiento del cáncer de mama y ovarios (Bernabeu *et al.*, 2016).

Para una preparación eficiente de las vesículas poliméricas es altamente deseable un control exhaustivo de la morfología junto con una alta estabilidad *in vivo* para su posible aplicación biomédica (Deng *et al.*, 2017; Grillo *et al.*, 2018). En este sentido, se han sintetizado copolímeros dibloque a partir de PEG y policaprolactona (PCL) con la misma composición de cadenas hidrofílicas e hidrofóbicas, que formaron el par perfecto como un sistema binario [Esquema 1.13 (Wang *et al.*, 2017b)]. El proceso de autoensamblado dotó a las vesículas de excelentes propiedades, constituyendo un sistema muy prometedor como portador de determinados fármacos anticancerosos y de proteínas.



Esquema 1.13. Copolímeros dibloque autoensamblables que formaron PSM.

Por otro lado, la proliferación de bacterias que han desarrollado resistencia a los antibióticos se está convirtiendo en un gravísimo problema de salud pública. La introducción de PEG en las cadenas de micelas poliméricas mixtas permitió un aumento importante de la solubilidad y, en consecuencia, de la

biodisponibilidad del antimicrobiano y antifúngico ensayado, anfotericina B (Vakil y Kwon, 2006).

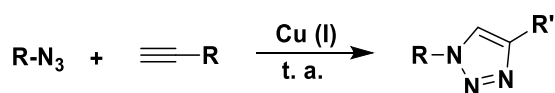
1.1.5 Politriazoles funcionalizados

Los politriazoles (PT) son quizás uno de los grupos de polímeros menos estudiados si se compara con otras familias de polímeros. Lo más general ha consistido en hacer uso de la reacción “click” azida-alquino para generar anillos de triazol en derivatizaciones de cadenas poliméricas. Los polímeros conteniendo anillos de triazol han sido investigados en nanoingeniería (Such *et al.*, 2012), terapia génica (Han *et al.*, 2017) y agentes antimicrobianos (Floros *et al.*, 2016), entre otros.

La química “click” descrita por K. B. Sharpless (Premio Nobel de Química 2001) es una filosofía química que ha tenido un extraordinario impacto en la química moderna. El concepto de química “click” define una metodología de síntesis que permite la obtención de estructuras complejas, a través de enlaces carbono–heteroátomo, partiendo de una serie de moléculas sencillas mediante reacciones eficaces (Kolb *et al.*, 2001). Se inspira en el hecho de que la naturaleza también genera sustancias al unir pequeñas unidades modulares. En general, una reacción “click” reúne las siguientes características: facilidad experimental, compatibilidad con una amplia variedad de grupos funcionales y condiciones de reacción, alta selectividad y regioespecificidad, alta economía atómica, estabilidad frente al oxígeno y al agua y aislamiento y purificación sencillos del producto final.

De todas las reacciones que han sido catalogadas como reacciones de tipo “click”, la reacción de Huisgen constituye una valiosa herramienta sintética debido a sus múltiples aplicaciones, tanto en síntesis orgánica como en otros

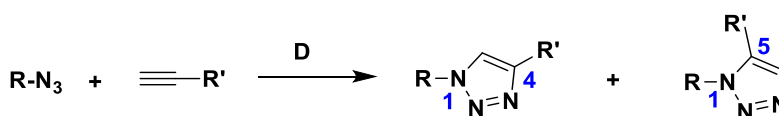
campos tales como las ciencias biomédicas y de los materiales (Kolb y Sharpless, 2003). Esta metodología fue descrita por primera vez por Huisgen para la síntesis de 1,2,3-triazoles (Huisgen, 1963), en la que los grupos funcionales azida y alquino son los precursores del nuevo anillo. Posteriormente se demostró que la reacción puede ser catalizada por compuestos de cobre con estado de oxidación +1 (Cu [I]) (Tornøe et al., 2002), aumentando así tanto la velocidad de reacción como la estereoselectividad (Appukkuttan *et al.*, 2004). Esta versión catalizada de la cicloadición 1,3-dipolar de azidas y alquinos se conoce con las siglas CuAAC (Esquema 1.14). La formación *in situ* de Cu (I) a partir de sales de Cu (II), normalmente sulfato de cobre pentahidratado, y un agente reductor como el ascorbato sódico ha sido el protocolo más ampliamente utilizado. Este tipo de reacción constituye, sin lugar a dudas, uno de los procesos catalíticos que más ha impactado en la química en los últimos años, con numerosas aplicaciones en campos tan diversos como la biología molecular, la farmacología y la nanoingeniería (Lutz y Zarafshani, 2008; Holub y Kirshenbaum, 2010; Aragao-Leoneti *et al.*, 2010; Such *et al.*, 2012).



Esquema 1.14. Cicloadición regioespecífica azida-alquino catalizada por Cobre (I) (CuAAC) conducente a triazoles 1,4-disustituídos.

A pesar de su demostrada fiabilidad, la reacción CuAAC presenta el problema de que los productos finales de la cicloadición catalizada pueden ir contaminados por residuos de cobre. La presencia de este metal es un inconveniente para la síntesis y/o funcionalización de los materiales para

determinadas aplicaciones, especialmente en biomedicina, debido a sus posibles efectos citotóxicos. Por otro lado, la reacción no catalizada, que se lleva a cabo sólo por calentamiento (AAC) (Esquema 1.15), conduce a la formación de triazoles de modo no regioselectivo (1,4- y 1,5-disustituidos). La pérdida de regioselectividad en el proceso hace que aumente la complejidad de las estructuras de los materiales producidos.

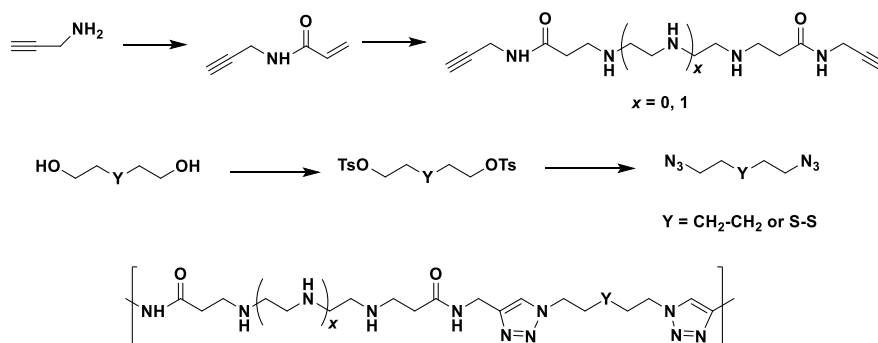


Esquema 1.15. Cicloadición térmica no regioselectiva azida-alquino (AAC) conducente a triazoles 1,4- y 1,5-disustituidos.

Un análisis de la bibliografía desde 2002 evidencia que la principal virtud de esta metodología sintética es su capacidad para interconectar diferentes subestructuras sobre un armazón de complejidad variada. Además, el anillo de 1,2,3-triazol tiene la posibilidad de actuar como mimético de un enlace peptídico debido a que los 1,2,3-triazoles tienen una localización atómica y unas propiedades electrónicas similares a las de la función amida, pero con la ventaja añadida de la alta resistencia a roturas hidrolíticas y a los procesos de oxidación o reducción.

Mediante química “click” se han sintetizado polímeros catiónicos lineales a partir de diazidas y dialquino-oligoaminas. Estos polímeros formaron poliplejos con plásmidos de ADN degradables por la reducción de grupos disulfuro presentes en las cadenas poliméricas [Esquema 1.16 (Wang *et al.*, 2011)]. Los polímeros con puentes disulfuro sensibles a la reducción

presentaron elevada eficacia de transfección, baja toxicidad *in vitro* y mucha menor toxicidad que sus análogos no reducibles.



Esquema 1.16. Politriazoles catiónicos para liberación de material genético.

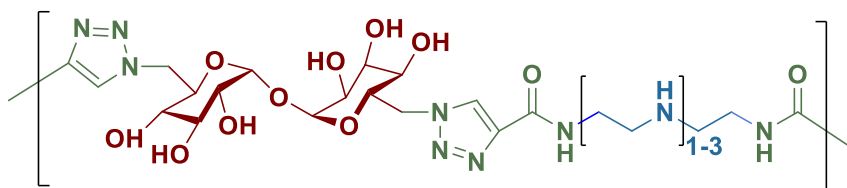
La introducción de grupos alquino y azida en azúcares permite el acceso a derivados tanto mono- como polifuncionalizados para la síntesis de polímeros mediante reacciones de cicloadición. Esta estrategia sintética permite la preparación de polímeros con unidades derivadas de carbohidratos en los que el anillo de triazol actúa como elemento de unión entre éstas y otras moléculas. Normalmente, la posición anomérica es la preferida para introducir funciones alquino o azida, pero también el resto de las posiciones del anillo de azúcar son modificables mediante una adecuada estrategia de protección-desprotección. Estos compuestos presentan un gran potencial en el estudio de procesos de reconocimiento molecular en los que participan los carbohidratos, con aplicaciones en biotecnología y biomedicina.

En la búsqueda de posibles tratamientos contra el cáncer, se descubrió que la galectina es una proteína producida en grandes cantidades por los tumores cuya función es formar nuevos vasos sanguíneos y deprimir el

The top structure shows a glucose molecule with acetyl groups at C2, C3, and C6, and azidoethoxy chains at C1 and C4. The bottom structure is identical except the azido groups are replaced by ethynyl groups.

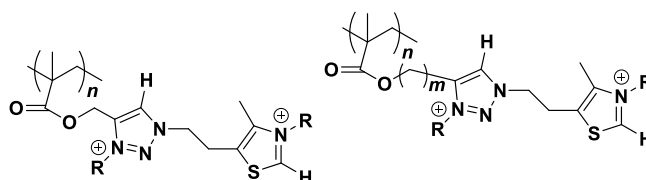
El acoplamiento de un 6,6'-diazido derivado de la trehalosa con varias α,ω -dipropargil oligoetileniminas [Esquema 1.18 (Srinivasachari *et al.*, 2006)] permitió obtener una serie de glicopolímeros con características estructurales adecuadas para la complejación de plásmidos de ADN y consumo celular de expresión transgénica. Estos polímeros demostraron ser buenos transportadores de ácidos nucleicos, tanto en ausencia como en presencia de suero, demostrando la capacidad de formar poliplejos muy estables, además

de actuar como un transportador celular eficiente con una toxicidad relativamente baja.



Esquema 1.18. Politriazoles derivados de trehalosa.

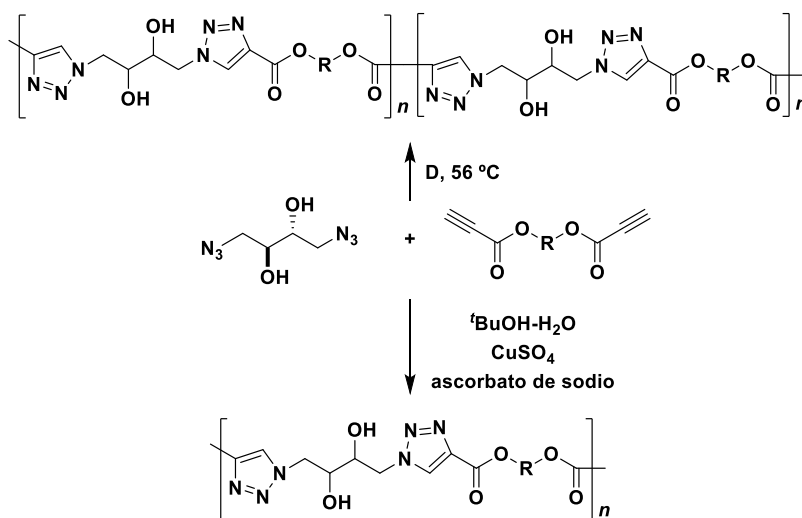
Dado que los compuestos químicos que contienen grupos amonio cuaternario poseen propiedades antimicrobianas y desinfectantes bien definidas, se diseñaron polímeros que portaban grupos 1,2,3-triazol inspirados en heterociclos azólicos encontrados en la naturaleza [Esquema 1.19 (Tejero *et al.*, 2015)]. La *N*-alquilación de estos polímeros condujo a polielectrolitos mono y dicatiónicos con naturaleza anfifílica. Se evidenció una importante actividad antimicrobiana altamente selectiva frente a diferentes microorganismos (bacterias u hongos) con aplicaciones biomédicas prometedoras.



R = metil, butil, octil, dodecil and hexadecil

Esquema 1.19. Politriazoles *N*-alquilados con actividad antimicrobiana.

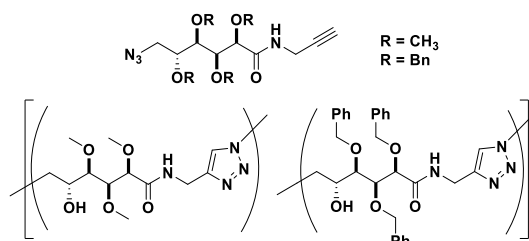
En nuestro grupo de investigación, se han preparado poliéstertriazoles derivados de azúcares conteniendo anillos de triazol en las cadenas poliméricas mediante reacciones de cicloadición 1,3-dipolar en su versión térmica clásica y mediante la reacción catalizada por Cu(I) [Esquema 1.20 (Bueno *et al.*, 2012)]. Los polímeros obtenidos mediante ambas técnicas presentaron valores de pesos moleculares y polidispersidades similares, fueron en ambos casos materiales hidrófilos, básicamente amorfos. Los ensayos de degradación hidrolítica evidenciaron un mecanismo de degradación mediante la ruptura de los enlaces éster, siendo más rápida la hidrólisis a pH básico que a pH neutro.



Esquema 1.20. Síntesis térmica y catalítica de poliéstertriazoles.

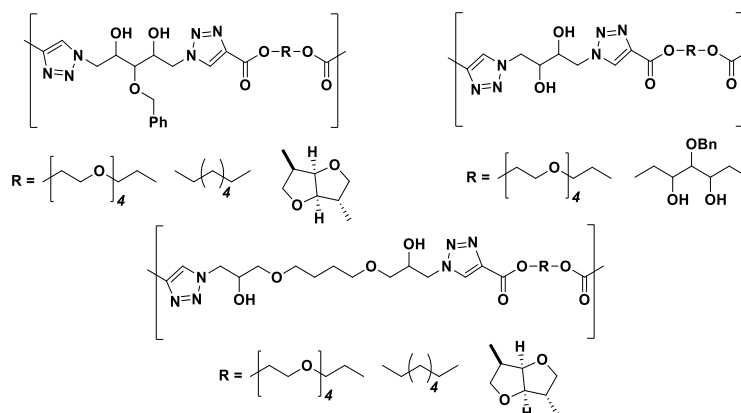
A partir de monómeros derivados de D-glucosa se sintetizaron poli- y copoli-amidotriazoles degradables hidrolíticamente mediante las dos técnicas

de cicloadición 1,3-dipolar descritas anteriormente [Esquema 1.21 (Molina-Pinilla *et al.*, 2014)]. Los polímeros regiorregulares presentaron valores de T_g más elevados. Adicionalmente, los grupos hidroxilo secundarios libres presentes participaron en reacciones de entrecruzamiento entre las cadenas poliméricas con HMDI dando lugar a hidrogeles.



Esquema 1.21. Copoliamidotriazoles derivados de D-glucosa.

Empleando la reacción CuAAC entre dialquinos con enlaces éster y diazidas, derivados de glucosa, arabinosa y eritrosa, se sintetizaron una serie de poliéstertriazoles de alto peso molecular hidrolizables a 50 °C y pH 7,4 [Esquema 1.22 (Hakkou *et al.*, 2015)]. A partir de estos polímeros funcionalizados se obtuvieron redes tridimensionales por reacciones de entrecruzamiento entre los grupos hidroxilo secundarios y HMDI. A medida que se incrementaba la reticulación, la red resultante presentó menor flexibilidad y, por lo tanto, la capacidad del hidrogel para absorber agua e hincharse disminuyó considerablemente.



Esquema 1.22. Poliéstertriazoles derivados de azúcares.

1.1.6 Reversible Addition-Fragmentation chain Transfer mediated Polymerisation-Induced Self-Assembly of Hydroxylated Block Copolymer Nanoparticles

1.1.6A Polymerisation Mechanisms

In recent years, the emergence of living radical polymerisation (LRP) has revolutionised polymer chemistry (Braunecker and Matyjaszewski, 2007; Zetterlund *et al.*, 2015). It is now relatively straight-forward to prepare functional block copolymer nanoparticles at high concentrations due to the advent of pseudo-living free radical polymerisation techniques, such as reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) when coupled with polymerisation-induced self-assembly (PISA) (Warren *et al.*, 2014; Canning *et al.*, 2016; Derry *et al.*, 2016; Moad, 2017). Specific mean degrees of polymerisation, narrow molecular weight distributions and functional polymers can be readily synthesised *via* polymerisation techniques such as nitroxide addition-fragmentation (NMP) (Sciannonea *et al.*, 2008), atom transfer radical polymerisation (ATRP) and reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) polymerisation (Moad *et al.*, 2009; Moad *et al.*, 2012).

However, these techniques require the use of mediating agents such as alkoxyamines, copper catalysts or organic thiocarbonyl compounds. RAFT polymerisation has also been used to prepare diblock copolymers nanoparticles *via* sulfur-free RAFT emulsion polymerization (Engelis *et al.*, 2017).

The thiocarbonylthio group is a very versatile functional group, which can either be exploited for polymer chain end functionalization or might need to be removed for certain applications (Perrier *et al.*, 2017). The thiocarbonylthio end-group can be reduced to a thiol by hydrolysis or aminolysis. This process is one of the most commonly encountered end-group functionalization of a RAFT polymer. However, the most effective processes to get a complete removal of the thiocarbonylthio group are thermolysis and radical-induced transformation. Thermolysis is a simple and powerful method for total end-group removal and introduction of an alkene at the polymer chain end. On the other hand, the radical-induced transformation is more versatile, as it allows the potential alternative chain end functionalization. A radical is generated *in situ* followed by its fragmentation or reduction using a metal catalyst or long-wave ultraviolet irradiation that leads to photolytic cleavage of the thiocarbonylthio end-group.

1.1.6B Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer Polymerisation (RAFT Polymerisation)

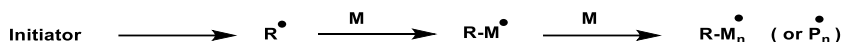
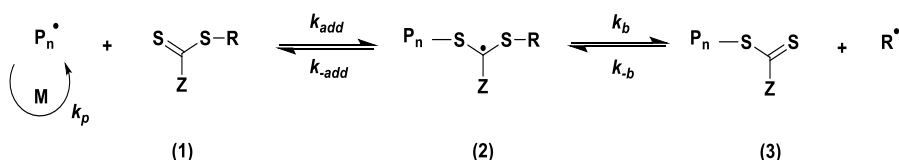
Chiefari and co-workers first reported RAFT polymerisation in 1998, where styrene and several methacrylate were polymerised in the presence of dithioester compounds (Chiefari *et al.*, 1998). In this paper, it was suggested that the polymerisation mechanism was based on the reversible addition-fragmentation chain transfer of polymer radicals between a dithioester

mediating chain-transfer agent. Similar to ATRP, RAFT can polymerise an extensive variety of functional monomers such as (meth)acrylates, (meth)acrylamides and styrenes, to obtain near-monodisperse polymers with M_w/M_n values typically of < 1.2)

RAFT technique is permissive of monomer functionality (including alcohols, amines and carboxylic acids) and can be used in either aqueous or organic media (Lowe and McCormick, 2007). RAFT chemistry enables the synthesis of well-defined diblock copolymers and affords good control over the M_n to produce polymers with narrow MWDs, but also allows the precise control over the target degree of polymerisation (DP) by carefully adjusting of the molar ratio of monomer concentration to the chain transfer agent (CTA). The mean DP for a RAFT polymerisation can be adjusted using the following equation (Equation 1.1).

$$DP = \frac{[M]}{[CTA]} \quad (1.1)$$

The initial step RAFT polymerisation is identical to free radical polymerisation: the decomposition of an initiator compound to form two free radicals (scheme 1.1). Reactions of the free radicals, I^\bullet , with monomer, M , followed by further propagation, results in propagating polymer radical, P_n^\bullet . Reversible chain-transfer between the CTA (1) and the propagating polymer radical generates an intermediate radical adduct (2), stabilised by the Z group on the CTA, to form a CTA-capped polymer chain (3) and release the leaving group radical, R^\bullet . The mechanism for this is shown in Scheme 1.1 (Moad *et al.*, 2005).

Initiation**Reversible chain-transfer**

Scheme 1.1. The RAFT Mechanism: Initiation and Reversible chain-transfer steps (Moad *et al.*, 2005).

The R^\bullet species performs as a secondary initiating species to propagate further monomer to produce a new polymer radical chain, P_m^\bullet . This undergoes rapid reversible transfer to form the CTA-capped polymer chain (3) *via* the stabilised intermediate (4). The chain equilibrium step favours this intermediate and consequently the instantaneous polymer radical concentration (P_m^\bullet or P_n^\bullet) is reduced, thus decreasing the rate of termination relative to propagation (see Scheme 1.2).

Due to the pseudo-living character of RAFT polymerisation, well-defined diblock copolymers can be readily synthesised, provided that the conversion of the first block is not too high thus preventing premature termination under monomer-starved conditions. Addition of 'B' monomer to a macromolecular chain transfer agent (or macro-CTA) based on monomer 'A' allows the formation of well-defined, linear AB diblock copolymers.

The R group controls the preference of the initial CTA radical adduct (2) to fragment to produce either R^{\bullet} or return to the propagating polymer radical. The R group should be a better radical leaving group than the polymer radicals, so a greater proportion of the intermediate species fragment to give products, rather than returning to the reactants (i.e. $k_{\beta} > k_{add}$). The R group should also be able to reinitiate the polymerisation (Keddie *et al.*, 2012).

The nature of the Z group determines the double bond character of the C=S bond in the CTA, and also the stability of the radical intermediate. These aspects influence the rates of addition to the CTA (k_{add}) and fragmentation of the intermediate species (k_{β}). An electron-withdrawing Z group destabilises the neutral CTA while stabilising the radical of the intermediate species, which increases the rate of addition and decreases the rate of fragmentation (Keddie *et al.*, 2012). The Z group of dithiocarbamate, xanthate and trithiocarbonate CTAs feature a heteroatom adjacent to the dithioester. Delocalisation of a lone pair of electrons from the nitrogen or oxygen atom of dithiocarbamates and xanthates respectively with the C=S π -electrons reduces the double bond character of the C=S bond. This reduces the reactivity of the CTA towards polymer radicals, thus decreasing k_{add} . The double bond character is maintained for trithiocarbonates, such as 4-cyano-4-(2-phenylethanesulfanylthiocarbonyl)sulfanyl-pentanoic acid (PETTC, Scheme 1.3b), which have a sulfur atom adjacent to the dithioester. This is because there is poor orbital overlap of the sulfur lone pair (which is in a sp^3 orbital) and the C=S π -orbital, hence k_{add} is reasonably high (Keddie *et al.*, 2012).

The relative rates of fragmentation and propagation manage the overall rate of polymerisation. RAFT polymerisation is a convenient technique for many monomers, including functional vinyl monomers. By optimising the choice of CTA for the specific monomer, many monomer classes including methacrylates, acrylates, acrylamides and acidic monomers can be

polymerised with good control over the molecular weight distribution (O'dian, 2004; Moad and Solomon, 2006). Methacrylates form fairly stable propagating radicals due to delocalisation of the radical with the adjacent carbonyl group, and the methyl group providing steric hindrance. MePETTC is a trithiocarbonate-based RAFT agent which is frequently used for the polymerisation of methacrylates (insert reference here) in a variety of solvents. Its fragmented R^\bullet species has greater stability than the propagating methacrylate radical because its cyanide group is very good at stabilising the adjacent radical. This ensures fragmentation to R^\bullet is favoured over returning to the propagating radical (i.e. k_β is greater than k_{-add}). The double bond character of the C=S bond is not significantly affected by the phenylethanesulfonyl Z group, so PETTC has reasonably high reactivity towards radicals and k_{add} is high.

1.1.6C Polymerisation-Induced Self-Assembly (PISA)

The self-assembly of AB diblock copolymers to afford nanoparticles has been of considerable interest to many research groups over the last fifty years. Numerous research groups have shown that polymerisation-induced self-assembly (PISA) can be utilized to prepare a wide range of nanoparticles at relatively high concentration directly in aqueous solution (Charleux *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Pei *et al.*, 2014; Warren and Armes, 2014; Figg *et al.*, 2015). A hydrophilic homopolymer (A) is chain-extended by a second hydrophilic monomer in aqueous solution. The nature of the monomer is carefully chosen such that it is water-miscible, but the growing polymer chains become increasingly insoluble as the polymerisation proceeds. At a critical DP, the B block becomes hydrophobic. This conduces to the AB block copolymers to self-assemble in situ to form sterically-stabilised nanoparticles, such that

the hydrophobic block (B) forms the core and is stabilised by the hydrophilic block (A). This process is represented in Figure 1.1.

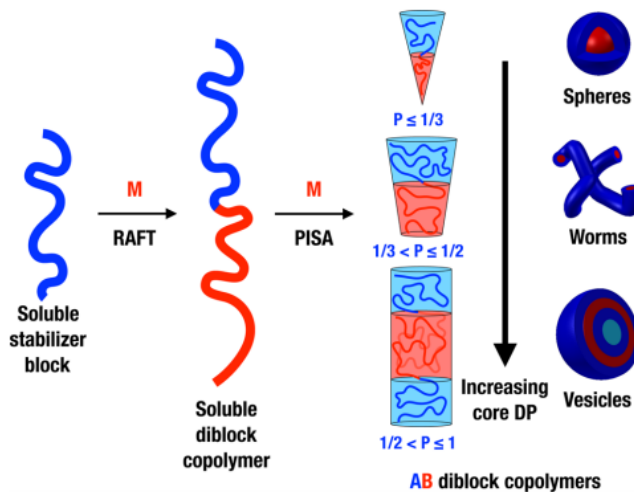


Figure 1.1. Schematic representation of RAFT-mediated PISA (Canning *et al.*, 2016).

Block A performs as a steric or electrostatic stabiliser; it gives a corona to impart colloidal stability and avoid macroscopic precipitation. By changing the mean DPs of the two blocks, either spherical or higher order morphologies – such as worms, vesicles and lamella - can be prepared (Warren and Armes, 2014; Canning *et al.*, 2016; Derry *et al.*, 2016). The final copolymer morphology is dependent on three key parameters: the copolymer concentration (a kinetic effect) and the mean DPs of the core-forming and stabiliser block. The morphology of the nanoparticles obtained can be qualitatively described using packing parameter, P , depends on v , the volume of the core-forming chain, l_c , critical chain length of the core-forming block and a_o , the head group area of the stabiliser block (see equation 1.2). The value of P (packing parameter)

determines whether a spherical micelle, cylindrical/worm-like micelle or vesicles are observed (Nagarajan, 2002; Blanazs *et al.*, 2009).

$$P = \frac{V}{al} \quad (1.2)$$

If $P < 1/3$, the high molecular curvature produces cones that pack together to form spherical micelles. When $1/3 < P < 1/2$ (medium curvature), truncated cones are formed by the intermediate molecular curvature and cylindrical micelles are formed, when $1/2 < P < 1$ the relatively low molecular curvature gives rise to cylinders and produces curved lamellae or vesicles (see Figure 1.1).

The final copolymer morphologies are also very sensitive to the mean DP of the macro-CTA. A longer macro-CTA (or stabiliser block) requires a longer core-forming block to produce the same molecular curvature. The particle morphology obtained in RAFT-mediated PISA formulations is assessed by transmission electron microscopy (TEM), which is used to construct a ‘post mortem’ diblock copolymer phase diagrams.

In 2012, Blanazs and co-workers reported three phase diagrams detailing how the particle morphology is affected by copolymer concentration and the mean DPs of the PGMA and PHPMA blocks [Figure 1.2 (Blanazs *et al.*, 2012a)]. When the PGMA DP fixed at 47, the resulting phase diagram has no concentration dependence (Figure 1.2a). Nevertheless, on increasing the PHPMA DP an evolution in particle morphology from spheres to worms and then to vesicles is observed, as expected. Conversely, in the case of the PGMA₇₈ phase diagram (Figure 1.2b) only spherical nanoparticles are obtained at a copolymer concentration of 10% w/w, regardless of the PHPMA DP. This is shown in the PGMA₇₈ phase diagram by the presence of three pure phase spaces corresponding to spheres, worms and vesicles at solids concentrations

above 17% w/w. In PISA formulations, the worm phase is typically quite narrow relative to the sphere and vesicle phase space. For the PGMA₄₇ phase diagram the width of the worm phase is approximately 50 units of HPMA while the sphere and vesicular phases are much larger. The phase diagram for PGMA₁₁₂ is far simpler than the PGMA₄₇ and PGMA₇₈ phase diagrams (Figure 1.2c). Only spherical micelles are observed up to a PHPMA DP of 800 and for copolymer concentrations of 15% w/w, although higher order morphologies are accessible as mixed phases at or above 20% w/w and above. By collating all the data from these phase diagrams (and other PISA syntheses not reported by Blanazs and co-workers) a master phase diagram can be constructed (Figure 1.2d). This phase diagram shows the relationship of stabiliser DP and core-forming block DP on particle morphology. Together, these four phase diagrams show how to reproducibly target spheres, worms or vesicles for the PGMA-PHPMA formulation (see Figure 1.2d).

Another water-soluble macro-CTA that has been successfully chain-extended with HPMA under RAFT aqueous dispersion conditions is poly(ethylene glycol), PEG₁₁₃ (Warren and Armes, 2014). PEG is an attractive polymer to use because of its biocompatibility, commercial availability, viability to industry and low cost. Furthermore, monomethoxy-terminated PEG (MeO-PEG-OH) can be purchased with predefined molecular weights of 2 kg mol⁻¹, 5 kg mol⁻¹ or 10 kg mol⁻¹, corresponding to mean DPs of 45, 113 and 226, respectively. Although RAFT polymerisation allows the preparation of copolymers with predefined DPs, in practise it is actually quite difficult to prepare two macro-CTAs with an identical mean DP. Therefore, converting well-defined PEG into a RAFT agent is an attractive route for ensuring the same molecular weight when preparing several different batches of the same macro-CTA.

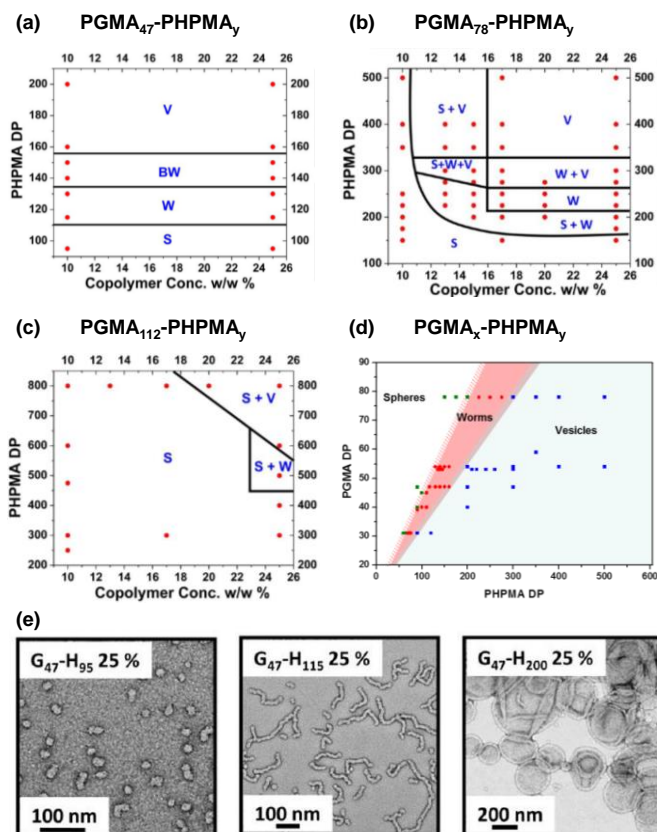


Figure 1.2. Three PGMA_x-PPHMA_y phase diagrams constructed by Blanazs and co-workers where the PGMA_x macro-CTA DP is varied such that $x =$ (a) 47, (b) 78 and (c) 112. (d) A master phase diagram of PGMA DP vs. PPHMA DP is also shown. (e) Representative TEM images obtained for PGMA₄₇-PPHMA_y spheres ($y = 95$), worms ($y = 115$) and vesicles ($y = 200$) prepared at 25% w/w solids (Blanazs *et al.*, 2012a).

In 2014, Warren and co-workers synthesised PEG₁₁₃ macro-CTA was chain-extension with HPMa produced amphiphilic PEG₁₁₃-PPHMA_y diblock copolymers [Figure 1.3a (Warren *et al.*, 2014)] *via* RAFT-mediated PISA and a phase diagram was constructed (Figure 1.3b) in a similar fashion to the PGMA-PPHMA examples discussed earlier. Pure phases of spheres, worms and unilamellar vesicles are obtained by increasing the target PPHMA DP, as expected. Either side of the pure phases are mixed phases, comprising either spheres and worms or worms and vesicles. A pure worm phase space was

identified, that forms a soft-free standing gel at room temperature. However, an irreversible worm-to-sphere transition was surprisingly observed on cooling to 4 °C: a significant difference compared to the PGMA-PHPMA formulation. It should be noted that the worm phase is, again, rather narrow. A new oligolamellar vesicular phase was also identified at high copolymer concentrations.

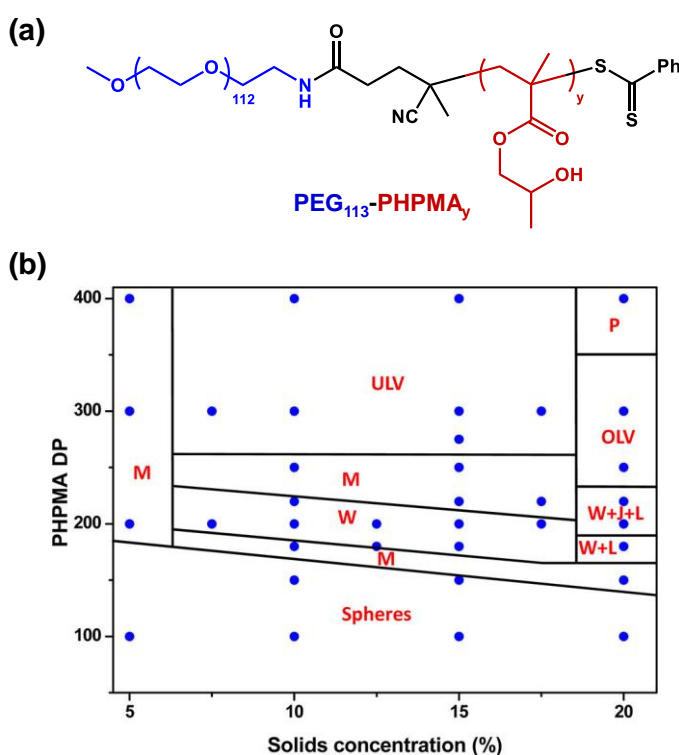


Figure 1.3. (a) Generic chemical structure of a PEG₁₁₃-PHPMA_y diblock copolymer. (b) Phase diagram constructed for such copolymers prepared by the RAFT aqueous dispersion of HPMA (Warren *et al.*, 2014). Abbreviations: W = worms, M = mixed phase, ULV = unilamellar vesicles, J = jellyfish, L = lamella, OLV = oligolamellar vesicles and P = precipitate.

1.1.6D Thermoresponsive Diblock Copolymer Worm Gels

Nowadays, there has been much attention in stimulus-responsive copolymer gels due their potential appliance in tissue engineering and drug delivery. Examples of thermo-, pH-, and light- responsive gels have been described in the literatura (Ma *et al.*, 2003; Schilli *et al.*, 2004; Madsen *et al.*, 2006; Woodcock *et al.*, 2010; Blanazs *et al.*, 2012b; Verber *et al.*, 2012; Canton *et al.*, 2016). A gel is defined as an infinite 3D network that is swollen by solvent. Chemical gels are formed by covalent cross-linking to hold a permanent network (Gutowska *et al.*, 2001). Self-assembled block copolymer worms can be achieved for certain diblock amphiphilic copolymers compositions. These worms form physical gels *via* multiple inter-worm contacts (Cunningham *et al.*, 2014).

However, of considerable biological interest is utilizing the thermoresponsive nature of PGMA-PHPMA block copolymer worm gels. A reversible worm-to- sphere morphological transition is observed on cooling (Blanazs *et al.*, 2012b; Kocik *et al.*, 2014; Penfold *et al.*, 2017a). Utilizing this gel-sol transition, Armes and coworkers have demonstrated the preparation of biocompatible, sterilisable worm- gels (Blanazs *et al.*, 2012b) and the first fully synthetic, solvent-free alternative for the cryopreservation of red blood cells (Mitchell *et al.*, 2016). For example, PGMA-PHPMA worms form soft, free-standing gels at high concentration. Reversible degelation is observed due to a reversible worm-to-sphere morphology transition that occurs upon cooling to 4 °C (see Figure 1.4) (Blanazs *et al.*, 2012b; Verber *et al.*, 2012; Cunningham *et al.*, 2014; Canton *et al.*, 2016). The free-standing physical hydrogel was formed, due to the inter-worm entanglements at 21 °C. The more interesting phenomenon is that gel dissolution occurs on cooling to 4 °C and the gelation could be repeated on heating back to 21 °C [Figure 1.4 (Blanazs *et al.*, 2012a)].

Furthermore, the rheological properties of PGMA-PPMA worm gels are unaffected by the media that they are dispersed in. For example, similar gel strength and critical gelation temperatures are observed in water, phosphate buffer solution and Nutristem™ media. The potential application of this very soft gel ($G' < 30$ Pa) as a stem cell storage medium has been reported [see Figure 1.4b (Canton *et al.*, 2016)]. Stem cells were shown to go into cell stasis when supported within such biocompatible worm hydrogels. Stem cells can be held in stasis within the gel at 37 °C for up to 14 days without significant cell death. Isolation of the stem cells from the gels results in retained viability and pluripotency (the ability to differentiate towards any cell type). These synthetic hydrogels could be an inexpensive potential solve for stem cell storage, instead of the high-priced and unhelpful cryogenic systems that are at the present time used. In this case, the highly-hydroxylated PGMA-PPMA worm-gels act as synthetic mimics of the natural mucin environment of hPSCs.

It is well-known that addition of biocompatible PEG to small molecule drugs can improve their pharmaceutical properties: a process known as PEGylation (Turecek *et al.*, 2016). Therefore, the use of PEG as a steric-stabiliser in PISA formulations has received increasing interest in the past few years (Warren *et al.*, 2014; Penfold *et al.*, 2016b; Blackman *et al.*, 2017; Penfold *et al.*, 2017b; Ren and Pérez Mercader, 2017; Tan *et al.*, 2017). As expected, a wide range of PEG-based block copolymer nanoparticles can be synthesised, under thermally-initiated or photo-initiated PISA conditions. Recently, two isothermal phase diagrams created for PEG₁₁₃-PPMA had been reported (Blackman *et al.*, 2017). Here, radical initiation was achieved using *via* photo-initiated RAFT route or from more traditional free-radical thermal initiation with. The authors discovered that using a thermal initiator resulted in lower order morphologies for the same block copolymer composition.

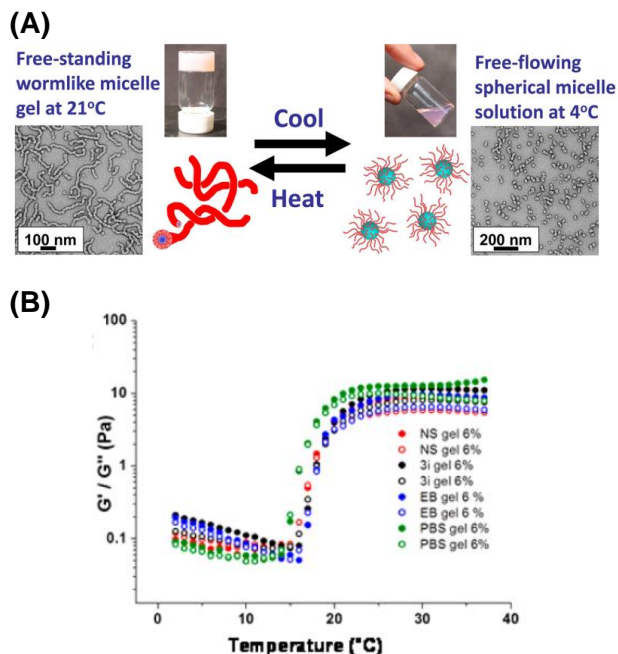


Figure 1.4. (a) Digital photograph, schematic cartoon and TEM images for 10% w/w PGMA₅₄-PPHMA₁₄₀ diblock copolymer worm gel undergoing a reversible worm-to-sphere transition on cooling from 25 °C to 4 °C (Blanazs *et al.*, 2012a); (b) Temperature dependence of the storage and loss moduli (G' , G'') observed on cooling a similar PGMA₅₅-PPHMA₁₃₅ 6% w/v worm gel reconstituted in various aqueous media from 37 to 2 °C at an applied strain of 1.0% and a fixed angular frequency of 1.0 rad s⁻¹ (Canton *et al.*, 2016).

Unlike the thermoreversible behavior exhibited by the PGMA-PPHMA worm gels, PEG₁₁₃-PPHMA₂₂₀ worm gels undergo an irreversible worm-to-sphere transition at 10% w/w solids upon cooling from 25 °C to 4°C, as shown by the temperature-dependent rheological studies shown in Figure 1.5 (Warren *et al.*, 2014). No explanation was offered as to why this transition is irreversible.

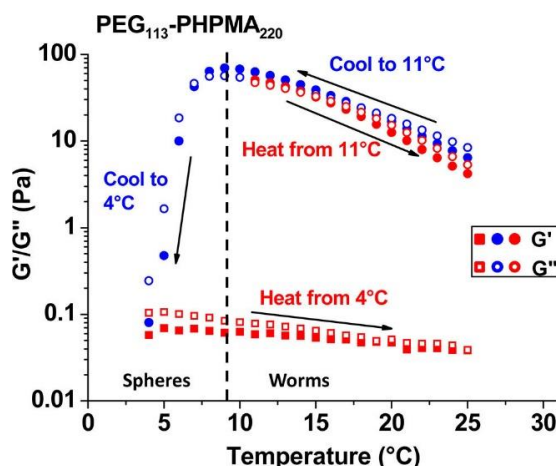


Figure 1.5. Temperature-dependent oscillatory rheological studies for PEG₁₁₃-PPHMA₂₂₀ worm gels at 10% w/w showing the irreversible gel-sol transition that occurs on cooling from 25 °C to 4 °C and returning to 25 °C (Warren *et al.*, 2014).

In PISA syntheses, a binary macro-CTA approach is a convenient way to prepare block copolymer nanoparticles that exhibit heterogeneity with respect to the stabilizing polymers in the nanoparticle corona. Typically, two macro-CTAs with different chemical functionality (Ladmiral *et al.*, 2013; Semsarilar *et al.*, 2013; Gonzato *et al.*, 2014; Williams *et al.*, 2016a, Williams *et al.*, 2016b) or the matching polymers with different mean DPs (Gonzato *et al.*, 2014) are mixed together and simultaneously chain-extended in the same reaction vessel. This approach results in entropic mixing of the original macro-CTAs in the nanoparticle stabilizer block. In this work, three macro-CTAs (a hydroxylated PGMA₅₉ and two non-hydroxylated PEGs with mean DPs of 45 and 113, are prepared. Then a binary macro-CTA approach is used to synthesize block copolymer nanoparticles with varying degrees of hydroxyl-functionality in the nanoparticle corona *via* two-routes.

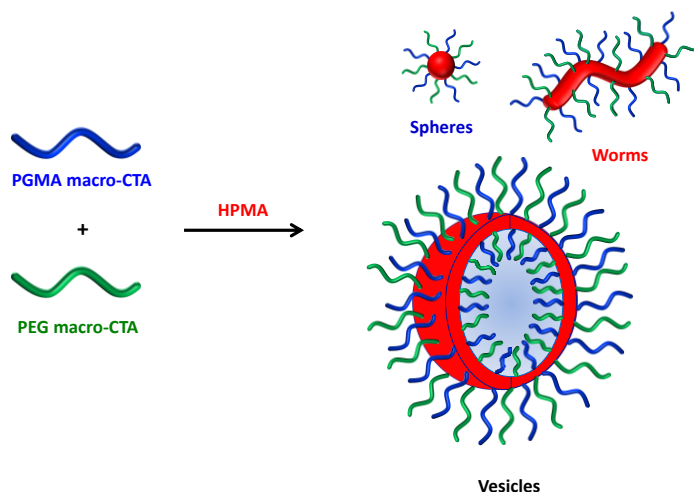


Figure 1.6. Schematic representation of the synthesis of diblock copolymers *via* PISA of HPMA using a binary mixture of PGMA and PEG macro CTAs.

Previous reports (Canton *et al.*, 2016) have shown that PGMA-PPHMA worm gels induce stasis in human embryonic pluripotent stem cells. Thus, we investigate if hydroxyl functionality is an essential requirement. A range of diblock copolymer nanoparticles are synthesised *via* reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) mediated polymerisation-induced self-assembly (PISA) to prepare block copolymer nanoparticles (see Figure 1.6). Importantly, a binary mixture of PGMA₅₉- and PEG_x ($x = 45$ or 113) diblock were simultaneously chain-extended with 2-hydroxypropyl methacrylate (HPMA) using a binary macro-CTA approach. For both PEG mean DPs, a phase diagram was created at a fixed copolymer concentration of 10% w/w, by systematically varying the target PPHMA DP (y) and the mol fraction of the PEG_x macro-CTA (n) with a general formula of $[(1 - n) \text{PGMA}_{59} + n \text{PEG}_x]\text{-PPHMA}_y$. When $x = 45$ only a very narrow worm phases is identified: but only when $n = 0$ (i.e. PGMA₅₉-PPHMA_y particles). However, increasing the PEG DP to 113 led to a significant increase in the worm phase space for n values ranging between

0.00 and 1.00. The thermoresponsive nature of these worms was assessed by visual inspection and gel rheology experiments. Importantly, specific compositions were identified that give reversible thermoresponsive behaviour. Thus, these worm gels can be used to investigate the hypothesis of how much hydroxyl functionality is required to induce stasis in human pluripotent stem cells.

1.2. Objetivos

Los objetivos generales de esta tesis se focalizan en la síntesis de materiales poliméricos inteligentes biodegradables y biocompatibles para la liberación selectiva y controlada tanto de fármacos como de material genético. Estos materiales deben presentar características estructurales que les permitan mimetizar procesos biológicos respondiendo a estímulos de entorno, en función de las aplicaciones buscadas.

1.2.1 Proyecto desarrollado en la Universidad de Sevilla

Los objetivos específicos planteados y desarrollados en el Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Universidad de Sevilla son los siguientes:

- Síntesis de monómeros funcionalizados susceptibles de polimerización bajo las condiciones adecuadas.

Estos monómeros deben presentar grupos funcionales isocianato e hidroxilo para su transformación en poliuretanos. A partir de diazido y dialquil monómeros se obtendrán politriazoles.

La presencia de grupos hidroxilo libres aportarán hidrofilia al material resultante. Los enlaces disulfuro asegurarán la degradación de los correspondientes polímeros en ambientes reductores. Los grupos amino protonables deben interaccionar con los grupos fosfato de los ácidos nucleicos.

- Síntesis de poliuretanos y copoliuretanos mediante reacciones de poliadición de los monómeros conteniendo grupos isocianato con alditoles y dioles biocompatibles.

- Síntesis de politriazoles mediante reacciones “click” azida-alquino catalizadas y térmicas.

- Caracterización estructural y estudio de las propiedades térmicas de los polímeros sintetizados.

- Estudios de degradabilidad y viabilidad celular de los polímeros seleccionados.

- Estudios de poliuretanos seleccionados como sistemas de liberación controlada, con fármacos modelo, en un sistema *in vitro* simulado del tracto gastrointestinal.

- Estudios de autoensamblado de los polímeros seleccionados.

- Estudios de complejación de polímeros catiónicos seleccionados con ADN y estudios preliminares de transfección.

1.2.2 Project Aims in the University of Sheffield

The main aim of the project developed in the University of Sheffield (UK) was to determine if hydroxyl functionality is necessary for irreversible worm-to-sphere transition upon cooling. To examine this hypothesis, a binary mixture of polyethylene Glycol (PEG) and poly(glycerol monomethacrylate) (PGMA) macro-chain transfer agents were chain-extended with poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (HPMA) *via* Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer (RAFT) polymerization to prepare a series of block copolymer nanoparticles.

CAPÍTULO

2

Materiales y Métodos

Los **reactivos y disolventes** utilizados en las distintas síntesis fueron comerciales (Sigma-Aldrich Chemical Co, Fluka, Merck y Panreac) y se utilizaron sin purificación previa. Los disolventes se secaron, cuando fue necesario, empleando los métodos estándares. Los reactivos que así lo requerían fueron almacenados en frío a 4 °C y se manejaron en atmósfera inerte.

Las **evaporaciones** de disolventes se han realizado a presión reducida (0,1 a 20 mmHg) y a temperaturas inferiores a 60 °C.

El seguimiento de las reacciones se realizó por control cualitativo mediante **cromatografía en capa fina** (c.c.f.), empleando cromatoplasmas de Sílica Gel Merck 60 F₂₅₄ sobre aluminio de 0,2 mm de espesor. La detección de las sustancias se realizó por exposición de las cromatoplasmas a una fuente de luz UV ($\lambda_{\text{max}} = 254 \text{ nm}$), y mediante revelado por inmersión en disoluciones de ninhidrina en EtOH al 0,1%, H₂SO₄ en EtOH al 10%, o ácido fosfomolibdico en EtOH al 3%, y posterior calentamiento.

Las **cromatografías en columna** con fines de purificación y separación de los diversos productos de reacción se llevaron a cabo mediante la técnica “flash chromatography”. Se utilizó Sílica Gel 60, con un tamaño de partícula de 230-240 mesh (Merk) como fase estacionaria. Los eluyentes empleados se indican en cada caso.

Los **puntos de fusión** se determinaron en un aparato *Gallenkamp* en tubos capilares abiertos y sin corregir.

Las **reacciones de polimerización** se llevaron a cabo en ausencia de humedad, bajo atmósfera inerte de argón. Todo el material que se utilizó se calentó a 80 °C antes de su uso durante toda una noche y posteriormente se

sometieron a vacío para eliminar los restos de humedad. Los monómeros usados se secaron a alto vacío durante un día.

Los **análisis elementales** cuantitativos se determinaron en los laboratorios de microanálisis del CITIUS, en la Universidad de Sevilla con un analizador elemental marca *LECO*, modelo *TruSpec micro*.

Los **espectros de absorción de IR** se registraron en un espectrofotómetro JASCO FT/IR-4200 equipado con ATR.

Los espectros de **Resonancia Magnética Nuclear de protones** (^1H RMN) se registraron en espectrómetros Bruker Avance 300 (300,1 MHz) y Bruker Avance 500 ó Bruker Avance III 500 (500,13 MHz) en el servicio de Resonancia Magnética Nuclear del CITIUS, en la Universidad de Sevilla. Las muestras se prepararon en disolución de deuterocloroformo, agua deuterada, dimetilsulfóxido deuterado o metanol deuterado. Las muestras insolubles en los disolventes deuterados comunes se registraron mediante resonancia magnética nuclear en estado sólido HR-MAS. Los valores de desplazamientos químicos (δ) se expresaron en ppm referidos al tetrametilsilano (SiMe_4) y los valores de las constantes de acoplamiento (J) se refirieron en Hertzios (Hz). La multiplicidad de las señales se indica mediante abreviaturas: s (singulete), sa (singulete ancho), d (doblete), dd (doble doblete), t (triplete), dt (doble triplete), m (multiplete).

Los espectros de **Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13** (^{13}C RMN) se realizaron en los mismos equipos nombrados anteriormente a 125 ó 75 MHz respectivamente. Los espectros se calibraron usando las señales de los disolventes como referencias internas. Para facilitar la interpretación de los espectros se utilizaron las siguientes técnicas:

- Experimentos DEPT (Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer).

La longitud de pulsos fue elegida de forma que aparecieran los carbonos primarios y terciarios en la fase positiva y los secundarios en la negativa.

- Experimentos de correlación heteronuclear (HETCOR ^1H - ^{13}C), que se indicarán en el texto con la abreviatura $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN.

- Experimentos de correlación homonuclear (COSY ^1H - ^1H).

Los **cálculos** llevados a cabo para determinar la composición de los coPU $\{[(\text{IpMan})_x\text{-DiT}_y]\text{DTDI}\}$ y $\{[(\text{Man})_x\text{-DiT}_y]\text{DTDI}\}$ mediante ^1H RMN se muestran a continuación:

$\{[(\text{IpMan})_x\text{-DiT}_y]\text{DTDI}\}$	$\{[(\text{Man})_x\text{-DiT}_y]\text{DTDI}\}$
Área de los protones $\text{NHCH}_2 = 8\text{H}$	Área de los protones $\text{NHCH}_2 = 8\text{H}$
Área de los protones de los grupos isopropilideno = $6x/100$	Área de los protones $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{O} = 4y/100$
$x + y = 100$	

Los **cálculos** para la determinación del peso molecular (M_n) de los PU catiónicos $[(\text{ACis})\text{DTDI}]$ y $[(\text{MCis})\text{DTDI}]$ mediante el análisis de los grupos terminales por ^1H RMN se realizaron según se indica:

PU $[(\text{Cis}_3\text{Ar})\text{DTDI}]$	PU $[(\text{Cis}_4\text{Man})\text{DTDI}]$
Calibración de los OH terminales = 2 H	
Área del resto de los protones de la UCR = 370 H	Área del resto de los protones de la UCR = 274 H
Número de protones/UCR = 53 H	Número de protones/UCR = 68 H
$M_0 = 707 \text{ g mol}^{-1} (\text{C}_{26}\text{H}_{53}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}_5)$	$M_0 = 868 \text{ g mol}^{-1} (\text{C}_{33}\text{H}_{68}\text{N}_6\text{O}_8\text{S}_6)$
$n = 370/53 = 6,98 \approx 7$	$n = 274/68 = 4,03 \approx 4$
$M_n = 7 \times 707 \text{ g mol}^{-1} = 4949 \text{ g mol}^{-1}$	$M_n = 4 \times 868 \text{ g mol}^{-1} = 3472 \text{ g mol}^{-1}$

Los **espectros de masas** se obtuvieron en el servicio de espectrometría de masas del CITIUS de la Universidad de Sevilla mediante un espectrómetro de masas Q-Exactive y Elite (Thermo Fisher) para los análisis con fuente electrospray (ESI-MS). También se han llevado a cabo espectros de masas en el Instituto de Investigaciones Químicas Isla de la Cartuja (CSIC) mediante la técnica de ionización por electrospray (ESI-MS) en un aparato Bruker Esquire 600. Las muestras se prepararon a concentraciones micromolares utilizando MeCN, MeOH y H₂O, o sus mezclas desionizadas, y se inyectaron directamente con un flujo de 120 µL/h.

Los análisis de **Cromatografía de Permeación en Gel** (GPC) se realizaron en un cromatógrafo Waters 1515 utilizando un detector de índice de refracción Waters 2414 y equipado con dos columnas Styragel® HR3 y HR4 (7,8 x 300 mm) dispuestas en serie y protegidas con una precolumna, termostatzadas a 60 °C y usando *N,N*-dimetilformamida (DMF) grado HPLC conteniendo LiBr (5,8 mM) como fase móvil. El flujo empleado fue de 1,0 mL/min y la concentración de los estándares y las muestras fue del 0,1% p/v. Los pesos moleculares fueron estimados usando patrones de poliestireno.

Los termogramas de **Calorimetría Diferencial de Barrido** (DSC) se adquirieron en un calorímetro DSC Q200 (TA Instruments) calibrado con indio. La cantidad de muestra empleada fue de 4 a 6 mg. La velocidad del primer calentamiento/enfriamiento fue de 10 °C min⁻¹ bajo un flujo de nitrógeno de 50 mL min⁻¹. Las temperaturas de transición vítrea (*T_g*) se determinaron a una velocidad de calentamiento de 20 °C min⁻¹ después de someter a las muestras fundidas a un enfriamiento rápido.

Los **análisis termogravimétricos** (TGA) se realizaron con una termobalanza SDT Q600 (TA Instruments) bajo atmósfera de nitrógeno (flujo de 100 mL min⁻¹) a una velocidad de calentamiento de 10 °C min⁻¹.

Los **estudios de higroscopicidad** se realizaron siguiendo el método descrito (Mori *et al.*, 1975). Los polímeros en polvo se secaron a vacío y posteriormente, se mantuvieron en una atmósfera saturada de humedad a temperatura ambiente. El proceso de absorción de agua fue controlado hasta peso constante de las muestras en periodos de tiempo determinados. Los resultados se expresan como el porcentaje de aumento de peso respecto al inicial.

Los **estudios de degradación** se llevaron a cabo sobre discos preparados por compresión directa de los polímeros seleccionados en polvo (20-40 mg) a 10 Ton de presión durante 5 minutos.

En el caso de la **degradación mediada por GSH**, los discos se sumergieron en una disolución 0,1 M de γ -glutatión (10 mL de disolución tampón 0,1 M) a pH 7,00. Se pasó una corriente de argón durante 15 minutos a través de la disolución y se sellaron los viales. Los experimentos se llevaron a cabo a $37 \pm 0,5$ °C agitando las muestras mediante un agitador orbitálico a 200 rpm para asegurar el acceso de GSH a toda la superficie de las muestras de polímero. Para evitar la pérdida de actividad con el tiempo, las disoluciones de GSH se cambiaron cada dos días y se reemplazaron con disoluciones recién preparadas. El proceso fue monitorizado a períodos de tiempo exactos (1, 2, 4, 7, 14, 21 y 28 días). Transcurridos estos tiempos de incubación, se adicionaron secuencialmente 10 mL de una solución tampón de fosfato (pH 8,00) y ácido yodoacético (0,186 g, 1 mmol). La mezcla se agitó a 25 °C durante 1 hora y, posteriormente, la fase líquida se eliminó, y los discos se lavaron exhaustivamente con agua Milli-Q (3 x 10 mL) y se secaron a vacío a 40 °C hasta peso constante. El proceso de degradación y la pérdida de peso molecular se analizaron por GPC y SEM.

En cuanto a los **estudios de degradación hidrolítica**, los discos preparados de polímero se sumergieron en 5 mL de una de las siguientes soluciones tampón: tampón citrato de pH 2,00, tampón fosfato de pH 7,00, tampón borato de pH 8,00 o tampón carbonato de pH 10,00. Los viales se sellaron y se calentaron a 37 °C por periodos de tiempo determinados. Los experimentos se extendieron a lo largo de 28 y 70 días. En el caso de la incubación a pH 7,00, las muestras se agitaron en un agitador orbitálico a 200 rpm. Al final de los periodos de incubación programados, los discos se retiraron del medio de incubación, se lavaron exhaustivamente con agua Milli-Q, se secaron hasta peso constante y se analizaron por GPC y SEM.

Los **estudios de liberación de fármacos** se han llevado a cabo en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Sevilla bajo la dirección del Prof. Dr. Isidoro Caraballo. Se elaboraron lotes de comprimidos matriciales de 250 mg de peso cada uno empleando los polímeros seleccionados y teofilina como fármaco modelo, mediante compresión directa o por compresión asistida por ultrasonidos. Los ensayos se realizaron utilizando el método de paleta en un aparato de disolución Sotax AT7 Smart USP (Allschwil, Suiza). Para simular las condiciones gastrointestinales, se modificó ligeramente el método descrito (Schellekens *et al.*, 2007), creando un entorno reductivo durante la última fase, correspondiente al colon. Cada ensayo se realizó por triplicado.

Las **vesículas poliméricas o PSM** se prepararon a partir de los copoliuretanos tri-bloque (100 mg) que se disolvieron en THF (10 mL) bajo atmósfera de argón. A estas disoluciones se le adicionó agua Milli-Q (20 mL) bajo agitación vigorosa a una velocidad de 0,1 mL h⁻¹ mediante una bomba de perfusión. Una vez finalizada la adición, se abrió el matraz al aire durante aproximadamente 72 h para conseguir una evaporación lenta del THF, siguiendo el procedimiento descrito (Shi *et al.*, 2009).

Las **imágenes de microscopía** se han obtenido en el servicio de microscopía del CITIUS de la Universidad de Sevilla. Las micrografías **SEM** se registraron en un microscopio DUAL BEAM AURIGA (ZEISS). Las imágenes **TEM** se obtuvieron mediante un microscopio electrónico de transmisión Philips CM-200 equipado con una cámara Olympus QUEMESA. Las imágenes obtenidas por **STEM** se realizaron con un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM) tipo Schottky (FEI ATENEO).

El **tamaño de partícula y la distribución de los PMS** se determinaron en el Instituto de Investigaciones Químicas Isla de la Cartuja (CSIC) mediante dispersión de luz dinámica (DLS) con un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) tomando como ángulos de dispersión 12,8 y 173°. Las dispersiones acuosas se diluyeron a 2,5 mg mol⁻¹.

El **tamaño de los poliplejos politriazol/ADN** y las medidas de **potencial Z** se determinaron mediante dispersión de luz dinámica (DLS) en el Instituto de Investigaciones Químicas Isla de la Cartuja (CSIC) (1) y en el Departamento de Química de la Universidad de Sheffield (Reino Unido) (2) en función del ADN empleado. Las medidas se llevaron a cabo en equipos Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). Se prepararon muestras de los complejos PT/ADN en las relaciones N/P 1, 2, 5 y 10 en agua Milli-Q. Para ello, se utilizó ADN lineal del timo de ternera (Calf thymus DNA, Sigma Aldrich Co.) (1) y el plásmido pEGFP (Clontech Laboratories) (2), respectivamente. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Los **ensayos de transfección** se llevaron a cabo en los laboratorios del Firth Court (Western Bank) en la Universidad de Sheffield (Reino Unido), utilizando el plásmido pEGFP de Clontech Laboratories que expresa la proteína fluorescente EGFP. El ADN plasmídico (pDNA) se aisló a partir de E. coli JM109 (Promega), cultivadas en medio Luria-Bertani (LB) con ampicilina a 37 °C,

utilizando columnas de Qiagen (Clontech Laboratories). La concentración de pADN se calculó usando el espectrofotómetro UV NanoDrop™ (Thermo Scientific).

Se utilizó la línea de células madre embrionarias humanas (hESC) MasterShef (grado clínico) 14 bajo la licencia del *Human Fertilisation and Embryology Authority* (HFEA) y depósito en el banco de células madre del Reino Unido. Las células se mantuvieron en cultivo libre de alimentación y fueron adheridas usando medio Nutristem® (Stemgent, UK) y una matriz extracelular Laminin 521 (Biolamina, Suecia) con paso no enzimático usando EDTA 5 μ M cada 5 días.

Para la obtención de los poliplejos polímero/ADN, los politriazoles se disolvieron en DMSO estándar de cultivo tisular y se esterilizaron por filtración usando filtros de PTFE de 0,2 μ m (Whatman). La solución stock de pDNA se preparó en agua desionizada y se esterilizó por filtración. La complejación de los pADN-politriazoles se realizó en placas estériles de 96 pocillos (Costar), donde el pDNA y los politriazoles se mezclaron en las relaciones N/P 1, 2, 5 y 10. Las mezclas se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y los complejos formados en las placas se diluyeron en medio Nutristem® hasta un volumen final de 100 μ L, para asegurar una concentración final de DMSO inferior al 0,5% v/v en el medio de transfección para evitar la toxicidad (Villa-Díaz *et al.*, 2010).

Las células hESCs se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de $1,5 \times 10^5$ células por pocillo y se cultivaron hasta una confluencia del 60% (típicamente 24 h). El medio celular se rellenó (200 μ L por pocillo) y, posteriormente, se añadieron 100 μ L del medio de transfección a cada pocillo y las placas se incubaron durante 16 h. La expresión de EGFP se determinó usando un sistema de obtención de imágenes con un microscopio de

epifluorescencia EVOS®. Como control positivo en la transfección se utilizó Lipofectamine® 2000.

Para el **estudio de las interacciones de los poliuretanos con el ADN** se llevaron a cabo medidas del potencial zeta, ζ , utilizando un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument) en el Centro de Investigación Tecnológica e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS). Este equipo determina la movilidad electroforética de la muestra a partir de la velocidad de las partículas, utilizando un velocímetro Doppler láser (LVD). Se utilizó una célula de policarbonato (DTS1060) y se termostatóizó a 25 °C mediante un sistema Peltier. Se realizaron nueve medidas para cada una de las disoluciones de polímero-ADN, considerando en todos los casos el valor promedio.

Las disoluciones de ADN y polímero-ADN se prepararon con buffer HEPES 40mM a pH 7,4 para garantizar la estabilidad. La concentración del ADN se mantuvo fija a 3.0×10^{-5} M y se varió la concentración de los polímeros estudiados.

El bromuro de etidio (EB) y los diferentes componentes del buffer HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil) piperazin-1-etanosulfónico y su sal sódica) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. El ADN de timo de ternera (Calf thymus DNA sodium salt) fue adquirido en Fluka sin previa purificación adicional. La concentración de polinucleótido, dada por los grupos fosfatos, se determinó espectrofotométricamente a partir de su absorptividad molar ($6600 \text{ ml}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ a 260 nm) (Liu *et al.*, 2005). Una prueba de electroforesis en gel de agarosa usando como marcador fluorescente bromuro de etidio indicó que el número medio de pares de bases por molécula de ADN está por encima de 10 000 pb (Secco *et al.*, 2012). Se encontró que la relación de absorbancia medidas a 260 y 280 nm de las disoluciones de ADN está entre 1,8 y 1,9, lo que sugiere la ausencia de proteínas (Saenger, 1984).

Los **estudios de viabilidad celular *in vitro*** se realizaron en el Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS) utilizando ensayos MTT (Van Meerlo *et al.*, 2011). Se prepararon disoluciones stock en DMSO al 4% en H₂O milliQ de los polímeros seleccionados ($1,132 \times 10^{-4}$ M) y de los complejos polímero/ADN a N/P 1 empleando el ADN de timo de ternera (Calf thymus DNA) en las mismas concentraciones. Estas disoluciones stock diluyeron 4 veces posteriormente. Las líneas celulares fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 3000 células por placa. Se usaron cinco líneas celulares de cáncer humano: A549 (adenocarcinoma del epitelio alveolar basal humano), H358 (cáncer de pulmón humano), HepG2 (cáncer de hígado humano), LS180 (adenocarcinoma epitelial de colon humano) y MCF7 (cáncer de mama), así como la línea celular normal RPE-1 (epitelio pigmentario de la retina). El medio de cultivo utilizado dependió de la línea celular ensayada: H358 (RPMI + 10% de FBS + 1% de penicilina/estreptomicina); A549, MCF7, LS180 y HepG2 (DMEM + 10% de FBS + 1% de penicilina/estreptomicina); RPE-1 (RPMI/F12 + 10% de FBS + 1% de penicilina/estreptomicina). Las medidas se tomaron en periodos de tiempo establecidos (24 y 96 h). Para ello, se añadió MTS (ROCHE) al medio y la viabilidad celular se midió por luminometría de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Cada una de las concentraciones analizadas se midió por triplicado.

Materials and methods for Chapter 5

Glycerol monomethacrylate (GMA; 99.8%; <0.06 mol% dimethacrylate impurity) was kindly donated by GEO Specialty Chemicals (Hythe, UK) and used without further purification. *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), poly(ethylene glycol) monomethyl ether (average M_n 2000 g mol⁻¹) and poly(ethylene glycol) monomethyl ether (average M_n 5000 g mol⁻¹) were purchased from Sigma Aldrich (UK). 4-(Dimethylamino)pyridine (DMAP) and 2-hydroxypropyl methacrylate (HPMA, 97%, mixture of isomers) were purchased from Alfa Aesar (UK). 2,2'-Azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propane] dihydrochloride (VA-044) was purchased from Wako Specialty Chemicals (UK). Anhydrous dichloromethane and chloroform were obtained from an in-house Grubbs purification system. All other chemicals and solvents were purchased from either VWR Chemicals or Sigma Aldrich and were used as received, unless otherwise stated.

All **NMR spectra** were recorded on a 400 MHz Bruker Avance-400 spectrometer operating at 298 K, with 64 scans averaged per per spectra. The RAFT agent (PETTC) and macro-CTAs were dissolved in CD₂Cl₂ for NMR analysis. The diblock copolymers were dissolved in CD₃OD. All shifts are reported in ppm (δ).

GPC studies were conducted using HPLC-grade DMF eluent containing 10 mM LiBr at 60 °C at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. The GPC set-up comprised an Agilent 1260 Infinity series degasser and pump, a Agilent PL-gel guard column, two Agilent PL-gel MIXED-C columns and a refractive index detector. Sixteen near-monodisperse poly(methyl methacrylate) standards ranging from M_p = 645 g mol⁻¹ to 2,480,000 g mol⁻¹ were used for column calibration. Aqueous copolymer dispersions were freeze-dried overnight to obtain pale yellow

powders. 0.50% w/w copolymer solutions were prepared in DMF containing DMSO (1% v/v) as a flow rate marker.

The intensity-average hydrodynamic diameter of diblock copolymer nanoparticles was determined by **Dynamic Light Scattering** (DLS). These measurements were taken using a Malvern Instruments Zetasizer Nano-ZS equipped with a 4 mW He-Ne laser operating at 633 nm. Aqueous dispersions were diluted to 0.2% w/w. Backscattered light was detected at 173°. The hydrodynamic diameter was calculated using the Stokes-Einstein equation (see Equation 2.1). Samples were equilibrated at 20 °C for 2 minutes then three successive measurements taken, from which the average was taken.

$$Dh = \frac{kT}{3\pi\mu D} \quad (2.1)$$

Transmission Electron Microscopy imaging was performed by N. Penfold, Y. Ning, E. Jan Cornel, F. Hatton and J. Lovett using an FEI Tecnai Spirit microscope fitted with an Orius SC1000B Camera operating at 80 kV. Samples were diluted with filtered water to 0.1% w/w. Copper/palladium grids (Agar Scientific) were coated with a thin film of amorphous carbon in-house then glow-discharged for 45 seconds to create a hydrophilic surface. 5 µl of diluted sample were dropped onto the grid, left for 90 seconds to adsorb then blotted with filter paper. The grid was then negatively stained with uranyl formate (0.75% w/w aqueous solution), blotted and dried using a vacuum hose.

Oscillatory gel **rheology experiments** were performed using an AR-G2 rheometer equipped with a variable temperature Peltier plate. A 40 mm 2° aluminium cone and a solvent trap were used. The storage (G') and loss (G'')

moduli were determined for a 10% w/w aqueous copolymer dispersion as a function of temperature using the above conditions, with 6 minutes equilibration time being allowed for each 1 °C increment.

CAPÍTULO

3

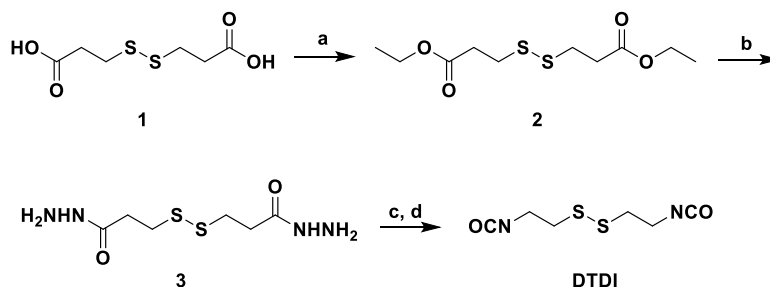
Poliuretanos funcionalizados

3.1 Homo- y copoliuretanos

3.1.1 Síntesis de monómeros

En primer lugar, se describe la preparación de monómeros bifuncionales para la obtención de homopoliuretanos (PU) y copoliuretanos (coPU) mediante reacciones de poliadición. Se han preparado el 2,2'-ditiodietildiisocianato (DTDl) y los derivados de D-manitol 3,4-*O*-isopropilidén-D-manitol (IpMan), 2,4:3,5-di-*O*-isopropilidén-D-manitol (DlpMan-A) y 2,3:4,5-di-*O*-isopropilidén-D-manitol (DlpMan-B).

La síntesis de DTDl se llevó a cabo en tres etapas, a partir del ácido 3,3'-ditiopropiónico (**1**), según el método descrito (Teramura *et al.*, 2007) introduciendo algunas modificaciones. El 3,3'-ditiodipropionato de dietilo (**2**) intermedio se preparó mediante destilación azeotrópica utilizando un sistema Dean-Stark, con etanol en tolueno conteniendo ácido sulfúrico durante 15 h. Después se adicionó una disolución acuosa al 65% de hidrazina monohidrato y se obtuvo la dihidrazida **3** (Vercruysse *et al.*, 1997). Posteriormente, se añadió ácido clorhídrico acuoso a 0 °C, seguido de una disolución de nitrito de sodio. La mezcla de reacción se calentó a reflujo para dar DTDl con un rendimiento global del 76% (Esquema 3.1).

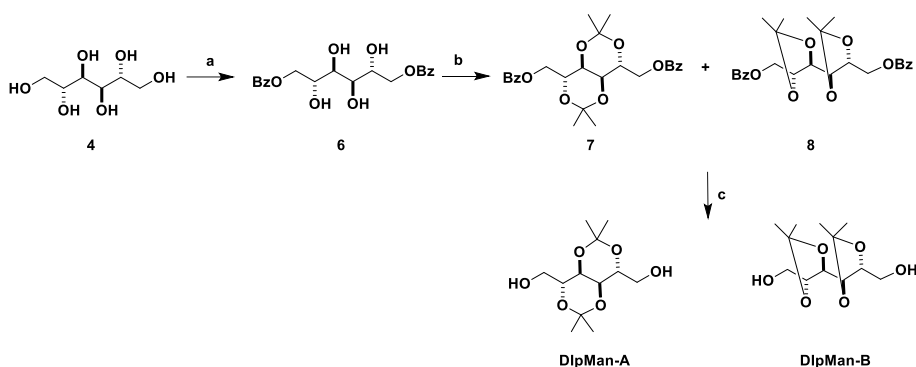


Esquema 3.1. (a) EtOH, tolueno, H₂SO₄, 150 °C; (b) H₂NNH₂, MeOH, t.a.; (c) HCl, H₂O, 0 °C; (d) NaNO₂, tolueno, 80 °C.

Chemical reaction scheme showing the synthesis of IpMan from compound 4. Compound 4 is a polyol with four hydroxyl groups. It reacts with a cyclic acetal-protected ketone (a) to form intermediate 5, which is a complex bicyclic structure with multiple acetal and ketone groups. Intermediate 5 then reacts with a second reagent (b) to yield the final product, IpMan, which is a polyol with a different stereochemistry than compound 4.

Los monómeros 2,4:3,5-di-*O*-isopropilidén-D-manitol (DlpMan-A) y 2,3:4,5-di-*O*-isopropilidén-D-manitol (DlpMan-B) se obtuvieron de acuerdo con los correspondientes procedimientos descritos [Esquema 3.3 (Gawronska, 1988)]. En primer lugar, se hizo reaccionar D-manitol con cloruro de benzoílo en piridina para obtener 1,6-di-*O*-benzoil-D-manitol (**6**). Este compuesto se trató con 2,2-dimetoxipropano y ácido *p*-toluénsulfónico a 80 °C durante 1 hora para dar lugar a la mezcla de los derivados 1,6-di-*O*-benzoil-2,3:4,5-di-*O*-isopropilidén-D-manitol (**7**) y 1,6-di-*O*-benzoil-2,4:3,5-di-*O*-isopropilidén-D-manitol (**8**) como un aceite incoloro. El tratamiento de la mezcla de dibenzoatos **7** y **8** con metóxido de sodio en metanol-cloroformo seguido de

cromatografía en columna proporcionó los diacetales DlpMan-A y DlpMan-B con rendimientos del 35% y 32%, respectivamente.



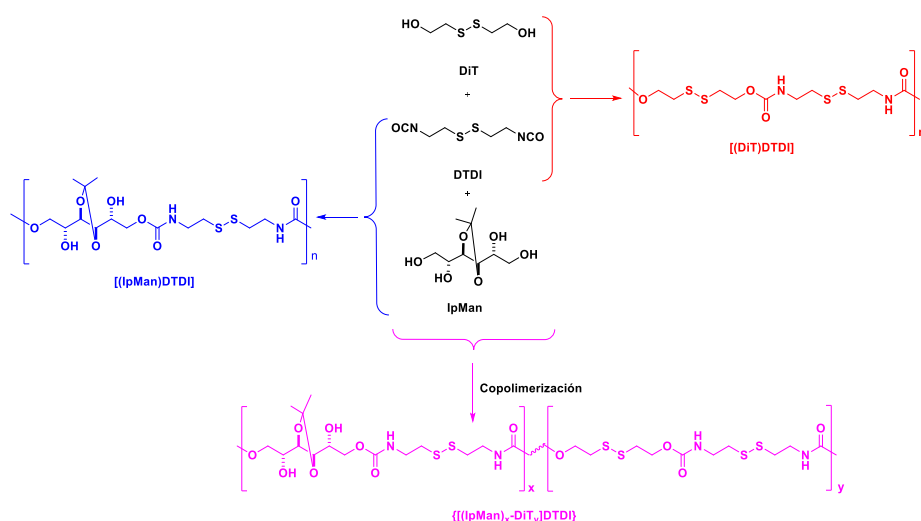
Esquema 3.3. (a) $\text{C}_6\text{H}_5\text{COCl}$, py, t.a.; (b) $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H}$, $(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{OCH}_3)_2$, reflujo; (c) NaOMe, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, t.a

3.1.2 Síntesis y caracterización estructural de homo- y copoliuretanos

Se ha sintetizado una serie de homo- y co-poliuretanos que contienen enlaces disulfuro en las cadenas poliméricas mediante reacciones de poliadición de los dioles IpMan y/o 2,2'-ditiodietanol (DiT) y el diisocianato DTDI, en THF a temperatura ambiente, con buenos rendimientos (Serie 1, Esquema 3.4). Los monómeros que proporcionaron la funcionalidad disulfuro fueron los dioles DiT y el diisocianato DTDI. Este último había sido utilizado previamente como agente de entrecruzamiento (Teramura *et al.*, 2007; Totani *et al.*, 2008) y más recientemente como monómero (Wang *et al.*, 2016). Los grupos hidroxilo primarios presentes en IpMan resultaron ser más reactivos frente a las reacciones de poliadición, aunque también se observó cierto grado de ramificación por reacción de los grupos hidroxilo secundarios libres. Por

otro lado, la presencia de éstos potenció la hidrofilia de los materiales obtenidos.

Los homopolíuretanos $[(\text{DiT})\text{DTDI}]$ e $[(\text{IpMan})\text{DTDI}]$ se obtuvieron a partir del diisocianato DTDI y los dioles DiT o IpMan, respectivamente, en THF con rendimientos del 90%. Los copolímeros $\{[(\text{IpMan})_x\text{-DiTy}]\text{DTDI}\}$ se prepararon a partir de ambos dioles DiT e IpMan, que se hicieron reaccionar con DTDI en distintas proporciones, en condiciones de reacción similares a las descritas anteriormente con rendimientos comprendidos entre el 56 y 74%. También se llevaron a cabo las reacciones en DMSO como disolvente, pero se obtuvieron polímeros coloreados y rendimientos más bajos.



Esquema 3.4. Reacciones de poliadición conducentes a homo- y coPU conteniendo enlaces disulfuro. Condiciones: dilaurato de dibutilestaño (II) como catalizador en THF, t.a., 24 h (Serie 1).

Los nuevos PU fueron caracterizados por FTIR-ATR, RMN, GPC y análisis térmico. Los pesos moleculares de todos los PU obtenidos oscilaron en el rango 23.000-97.000 g mol⁻¹, y los valores de polidispersidad estuvieron comprendidos entre 1,1 y 1,5, lo que indica homogeneidad en el tamaño de las cadenas poliméricas. Los datos referentes a los rendimientos, composición y peso molecular de todos los PU y coPU aquí descritos se detallan en la Tabla 3.1.

Se observaron bandas de absorción en los espectros de IR características del grupo carbamato, y las correspondientes a la presencia de azúcar en el caso del homopolímero [(IpMan)-DTDI] y de los coPU con mayor contenido en D-manitol. La constitución química de los PU y los coPU, así como la composición de los copolímeros, se determinó por RMN. En el Apéndice de espectros se proporcionan los espectros de ¹H RMN del monómero IpMan, el homoPU [(IpMan)DTDI], y de algunos coPU representativos, así como los espectros bidimensionales de correlación heteronuclear HETCOR estudiados para apoyar la asignación de las señales (Figuras A1-A11). Los espectros de ¹H RMN de los homoPU [(DiT)DTDI] e [(IpMan)DTDI] mostraron singuletes anchos para NH a δ 7,35 y 7,26 ppm, respectivamente. Los coPU mostraron dos señales anchas para NH a δ 7,35-7,39 y δ 7,25-7,27 ppm, correspondientes a los dos tipos de Unidad Constitucional Repetitiva (UCR) (Esquema 3.4). La composición correspondiente a los fragmentos DiT e IpMan de los coPU {[(IpMan)_x-DiT_y]DTDI} se determinó mediante la integración de las señales de los grupos isopropilideno a δ 1,29-1,32 ppm, y las señales a δ 3,20-3,30 ppm correspondientes a cuatro grupos metileno CH₂NHCOO presentes en todos los copolímeros (Capítulo 2, Materiales y métodos). Se pudo confirmar que la incorporación de ambos dioles durante la reacción de copolimerización fue esencialmente la misma que la de la fuente de alimentación inicial, con una distribución al azar. Sin embargo, debido al desplazamiento químico similar de

las señales correspondientes a CH_2NH y CH_2O de los dos dioles, no fue posible el establecimiento de posibles diádas. Los espectros de RMN de $[(\text{IpMan})\text{DTDI}]$ y los coPU $\{[(\text{IpMan})_x\text{-DiT}_y]\text{DTDI}\}$ revelaron un cierto grado de ramificación debido a la reacción de algunos de los grupos hidroxilo secundarios del monómero IpMan con el diisocianato DTDI. Debido a ello, el espectro de ^{13}C RMN de $[(\text{IpMan})\text{DTDI}]$ mostró dos señales diferentes en la región del grupo carbonilo: una a δ 156,3 ppm y otra señal adicional a δ 155,8 ppm, esta última asignada al efecto de ramificación. Igualmente se detectó más de una señal para cada carbono del esqueleto de IpMan, lo que se atribuyó a la ramificación. A partir de la integración de los espectros de ^1H RMN se estimó un grado de ramificación para el homoPU $[(\text{IpMan})\text{DTDI}]$ de aproximadamente un 10% y un 16-20% para los coPU. Las asignaciones de las señales correspondientes a la ramificación se indican con la abreviatura *ram* en las Figuras A2-A11 del Apéndice de espectros. Por otro lado, los espectros de RMN del homoPU $[(\text{DiT})\text{DTDI}]$ y de los coPU con mayor contenido en ditiodietanol mostraron la presencia de grupos terminales $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$. Del mismo modo, los espectros de ^{13}C RMN del homoPU $[(\text{IpMan})\text{DTDI}]$ y aquellos coPU con mayor contenido en IpMan exhibieron señales a δ 59,7 ppm, que se asignaron a grupos CH_2OH terminales (C-1, C-6) del azúcar.

Los polihidroxiuretanos seleccionados $[(\text{Man})\text{DTDI}]$, $\{[(\text{Man})_{81}\text{-DiT}_{19}]\text{DTDI}\}$ y $\{[(\text{Man})_{48}\text{-DiT}_{52}]\text{DTDI}\}$ (Serie 2, Esquema 3.5) se obtuvieron por hidrólisis de los grupos isopropilideno presentes en el azúcar del homopolímero $[(\text{IpMan})\text{DTDI}]$ y los coPU $\{[(\text{IpMan})_{81}\text{-DiT}_{19}]\text{DTDI}\}$ e $\{[(\text{IpMan})_{48}\text{-DiT}_{52}]\text{DTDI}\}$, por tratamiento con una mezcla de ácido trifluoroacético-agua 6:1 en THF. El proceso de desprotección se siguió por ^1H RMN y se comprobó que, para eliminar completamente los grupos protectores de las cadenas poliméricas, era necesario calentar la mezcla de reacción hasta 40-45 °C durante 24 h. Como se muestra en la Tabla 3.2, no se encontró correlación en el M_w de estos

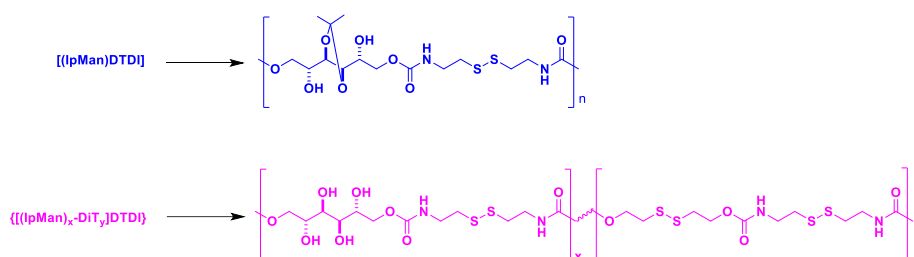
polihidroxiuretanos con respecto a los PU precursores protegidos (Serie 1). Este hecho se puede explicar en base a que el peso molecular de los polímeros fue estimado por GPC y los grupos hidroxilo libres de los nuevos materiales pueden establecer interacciones con la fase estacionaria de las columnas cromatográficas, alterando los tiempos de retención y por tanto el valor del M_w calculado. También cabría considerar que cierta degradación pudo tener lugar. La integración en los espectros de protones mostró que la proporción azúcar/DiT no se alteraba con respecto a la composición de los PU originales.

Tabla 3.1. Composición molar, rendimiento y pesos moleculares promedio de los homoPU [(IpMan)DTDI], [(DiT)-DTDI] y coPU $\{[(IpMan)_x-DiT_y]DTDI\}$ (Serie 1).

Composición								
Poliuretano	Alimentación		Calculado ^a		Rto. (%)	GPC		
	{[(IpMan) _x DiT _y]DTDI}					<i>M_w</i> ^b	<i>M_n</i> ^b	<i>M_w</i> / <i>M_w</i> ^b
	x	y	x	y				
[(IpMan)DTDI]	100	0	100	0	90	32.345	28.345	1,1
{[(IpMan) ₉₃ DiT ₇]DTDI}	90	10	93	7	64	52.350	35.830	1,5
{[(IpMan) ₈₁ DiT ₁₉]DTDI}	80	20	81	19	74	97.230	53.860	1,8
{[(IpMan) ₅₂ -DiT ₄₈]DTDI}	60	40	52	48	60	28.000	24.700	1,1
{[(IpMan) ₄₈ -DiT ₅₂]DTDI}	50	50	48	52	73	23.910	23.800	1,0
{[(IpMan) ₃₉ -DiT ₆₁]DTDI}	40	60	39	61	67	27.000	23.800	1,1
{[(IpMan) ₂₀ -DiT ₈₀]DTDI}	20	80	20	80	56	23.000	20.900	1,1
{[(IpMan) ₁₀ -DiT ₉₀]DTDI}	10	90	10	90	63	25.000	22.300	1,1
[(DiT)-DTDI]	0	100	0	100	90	24.700	21.780	1,1

^a Composición molar determinada por ¹H RMN.

^b Pesos moleculares promedio en peso y número expresados en g mol⁻¹ y polidispersidades estimadas mediante GPC en DMF/LiBr como fase móvil usando patrones de poliestireno.



Esquema 3.5. Polihidroxiuretanos obtenidos a partir de sus correspondientes PU mediante hidrólisis de los grupos *O*-isopropilideno. Condiciones: TFA/H₂O en THF, 40-45 °C, 24 h (Serie 2).

Tabla 3.2. Rendimiento y pesos moleculares promedio de los polihidroxiuretanos [(Man)DTDI] y {[(Man)_x-DiT_y]DTDI} (Serie 2).

Poliuretano ^a	Rto. (%)	GPC		
		<i>M_w</i> ^d	<i>M_n</i> ^d	<i>M_w/M_n</i> ^d
[(Man)DTDI] ^b	79	50.670	33.670	1,5
{[(Man) ₈₁ -DiT ₁₉]DTDI} ^c	81	48.660	31.880	1,5
{[(Man) ₄₈ -DiT ₅₂]DTDI} ^c	69	43.860	32.450	1,3

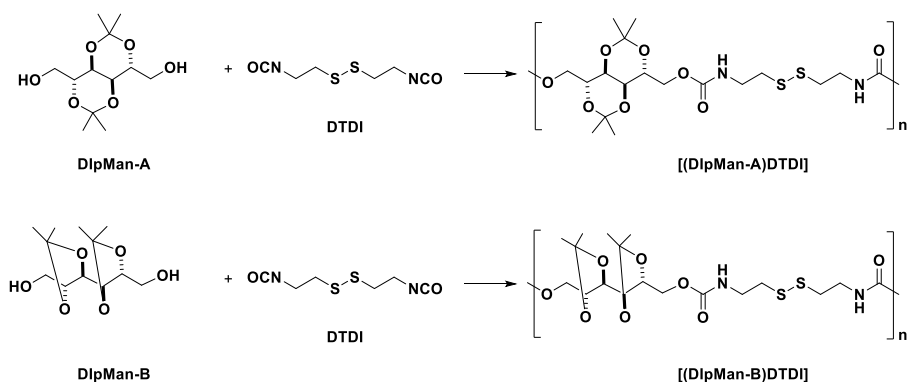
^a Polihidroxiuretanos obtenidos a partir de sus correspondientes *O*-isopropilidén derivados.

^b 40 °C; ^c 45 °C.

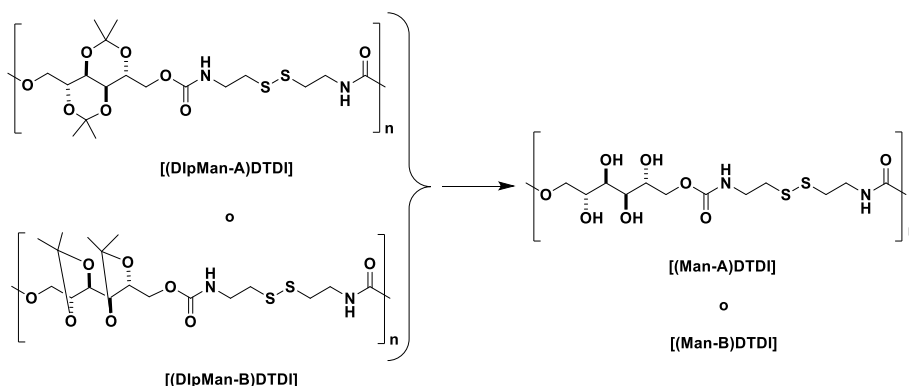
^d Pesos moleculares promedio en peso y número expresados en g mol⁻¹ y polidispersidades estimadas mediante GPC en DMF/LiBr como fase móvil usando patrones de poliestireno.

Con objeto de estudiar el efecto de la ramificación de los PU derivados de IpMan, [(IpMan)DTDI] e {[(IpMan)_x-DiT_y]DTDI} en relación a las propiedades de estos materiales, se llevó a cabo la síntesis de PU lineales. Estos polímeros se obtuvieron a partir de 2,4:3,5-di-*O*-isopropilidén-D-manitol (DIpMan-A) ó de 2,3:4,5-di-*O*-isopropilidén-D-manitol (DIpMan-B) y el diisocianato DTDI, como se muestra en el Esquema 3.6. Estos monómeros no ofrecen posibilidad de ramificación debido a que no poseen grupos hidroxilo secundarios libres. Los nuevos PU [(DIpMan-A)DTDI] y [(DIpMan-B)DTDI] lineales se obtuvieron como sólidos blancos con un rendimiento promedio del 80%. Los datos referentes a

La hidrólisis de los grupos isopropilideno se llevó a cabo con ácido trifluoroacético-agua en THF. Estos grupos se eliminaron más fácilmente que los grupos isopropilideno de los PU no lineales, siendo suficiente agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 3 h (Esquema 3.7). Los nuevos polihidroxuretanos [(Man-A)DTDI] y [(Man-B)DTDI] lineales se obtuvieron con rendimientos superiores al 80% y pesos moleculares elevados (Tabla 3.3).



Esquema 3.6. Reacciones de poliadición conducentes a los homoPU [(DipMan-A)DTDI] y [(DipMan-B)DTDI] lineales. Condiciones: dilaurato de dibutilestano (II) como catalizador en THF, t.a., 24 h.



Esquema 3.7. Polihidroxiuretanos obtenidos a partir de sus PU precursores acetalizados. Condiciones: TFA/H₂O-THF, t.a., 3 h.

Tabla 3.3. Rendimiento y pesos moleculares promedio de los PU lineales $[(DlpMan-A)DTDI]$ y $[(DlpMan-B)DTDI]$ y sus correspondientes polihidroxiuretanos derivados $[(Man-A)DTDI]$ y $[(Man-B)DTDI]$.

Poliuretano	Rto. (%)	GPC		
		M_w^a	M_n^a	M_w/M_n^a
$[(DlpMan-A)DTDI]$	80	74.100	48.700	1,5
$[(DlpMan-B)DTDI]$	82	57.000	41.800	1,4
$[(Man-A)DTDI]$	82	94.200	65.100	1,4
$[(Man-B)DTDI]$	88	66.500	46.900	1,4

^a Pesos moleculares promedio en peso y número expresados en g mol⁻¹ y polidispersidades estimadas por análisis mediante GPC en DMF/LiBr como fase móvil usando patrones de poliestireno.

3.1.3 Estudios de higroscopicidad

La higroscopicidad es la capacidad de los materiales para absorber humedad. La higroscopicidad de los polímeros depende del número de grupos polares que contengan. La capacidad de absorción de agua de un material se puede evaluar midiendo la cantidad de vapor de agua absorbido por muestras del polímero inicialmente secas, después de haber sido mantenidas en una

atmósfera con una humedad relativa del 100% a temperatura ambiente, durante un período de tiempo determinado.

Todos los PU y coPU seleccionados para estos estudios resultaron ser altamente higroscópicos, especialmente aquellos PU parcialmente ramificados con mayor contenido en D-manitol, $[(IpMan)DTDI]$ e $\{[(IpMan)_{81}-DiT_{19}]DTDI\}$. Los polihidroxiuretanos $[(Man)DTDI]$ y $\{[(Man)_{81}-DiT_{19}]DTDI\}$ aumentaron hasta 9 y 7 veces su peso inicial, respectivamente, después de 30 días (Figura 3.1). Sin embargo, ninguno presentó carácter de hidrogel.

En el caso de los homoPU lineales se observó que, aunque resultaron ser altamente higroscópicos, el porcentaje de absorción de agua fue menor que para los PU parcialmente ramificados (Figura 3.2). Tras 30 días de incubación, $[(DipMan-A)DTDI]$ y $[(DipMan-B)DTDI]$ aumentaron 2 veces su peso inicial, mientras que sus correspondientes *O*-desprotegidos $[(Man-A)DTDI]$ y $[(Man-B)DTDI]$ llegaron a aumentar hasta 5 veces su peso inicial tras el mismo periodo de tiempo.

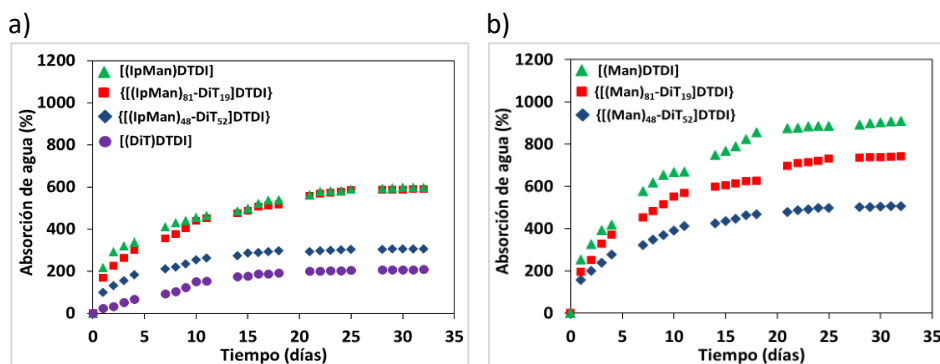


Figura 3.1. Absorción de agua de (a) PU *O*-protegidos (Serie 1); (b) *O*-desprotegidos (Serie 2) en función del tiempo, a temperatura ambiente y con una humedad relativa del 100%.

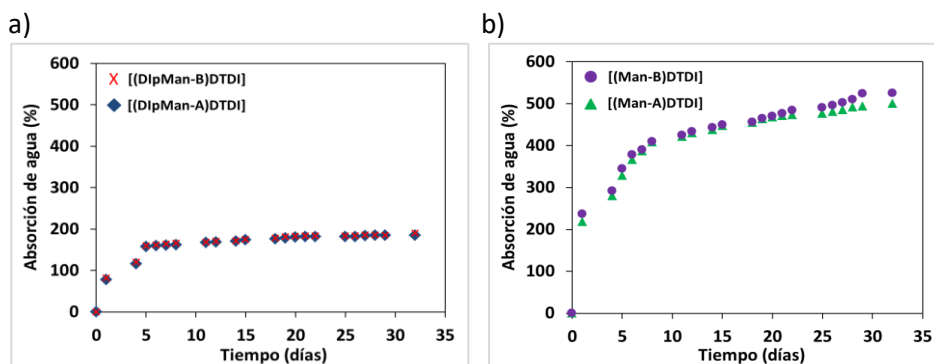


Figura 3.2. Absorción de agua de (a) PU *O*-protegidos lineales $[(DipMan-A)DTDI]$ y $[(DipMan-B)DTDI]$; (b) PU *O*-desprotegidos lineales $[(Man-A)DTDI]$ y $[(Man-B)DTDI]$ en función del tiempo, a temperatura ambiente y con una humedad relativa del 100%.

3.1.4 Propiedades térmicas

El comportamiento térmico de los nuevos materiales preparados ha sido comparativamente examinado por TGA y DSC. Los parámetros térmicos resultantes de este estudio se muestran en las Tablas 3.4 y 3.5 y las Figuras 3.3-3.7.

Los termogramas obtenidos por TGA para los homo- y coPU derivados de IpMan, $[(IpMan)DTDI]$ e $[(IpMan)_x-DiT_y]DTDI$, registrados bajo atmósfera inerte, se presentan en la Figura 3.3. Todos ellos presentaron un patrón de descomposición térmica similar, que comenzó a ser detectable aproximadamente a 200 °C, con temperaturas de inicio (medidas para un 10% de pérdida de peso) entre 220 y 258 °C excepto para $[(IpMan)_{93}-DiT_7]DTDI$, cuya descomposición comenzó a 150 °C. El proceso de descomposición transcurrió en una sola etapa, manteniéndose un perfil idéntico, con una temperatura de degradación máxima en el rango de 234-279 °C y obteniéndose, en todos los casos, un residuo por debajo del 10 % del peso inicial. A partir de estos datos, podemos afirmar que la incorporación de D-

manitol en las cadenas del homopolíuretano $[(DiT)DTDI]$ no alteró significativamente la estabilidad térmica de los coPU correspondientes (Tabla 3.4, Figura 3.3a). Este mismo comportamiento fue observado para los correspondientes derivados desprotegidos (Tabla 3.5, Figura 3.3b).

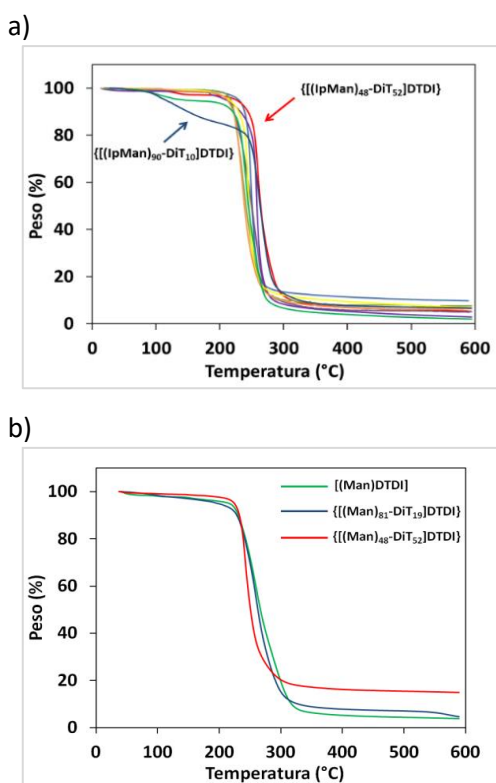


Figura 3.3. Curvas comparativas de degradación térmica obtenidas mediante TGA bajo atmósfera inerte de (a) PU *O*-protegidos (Serie 1); (b) PU *O*-desprotegidos (Serie 2). Peso (%) versus temperatura (°C).

Las curvas de calentamiento obtenidas mediante DSC de los PU con mayor contenido en D-manitol, $[(IpMan)DTDI]$ e $[[[IpMan]_{93}-DiT_7]DTDI]$, no mostraron transiciones endotérmicas asociadas a procesos de fusión, lo que puso de manifiesto la naturaleza esencialmente amorfa de estos materiales.

El resto de los coPU descritos presentaron dos picos endotérmicos (con la excepción de $\{[(IpMan)_{52}-DiT_{48}]DTDI\}$) asociados a procesos de fusión, en el rango de temperatura de 55-117 °C y con entalpías asociadas de 3-51 J g⁻¹, lo que es indicativo de la naturaleza semicristalina de estos materiales (Tabla 3.4). Como se muestra en esta tabla y en la Figura 3.4, los valores de T_g de los nuevos PU y coPU (Serie 1) pudieron detectarse claramente en las curvas de calentamiento registradas a 20 °C min⁻¹ a partir de las muestras fundidas.

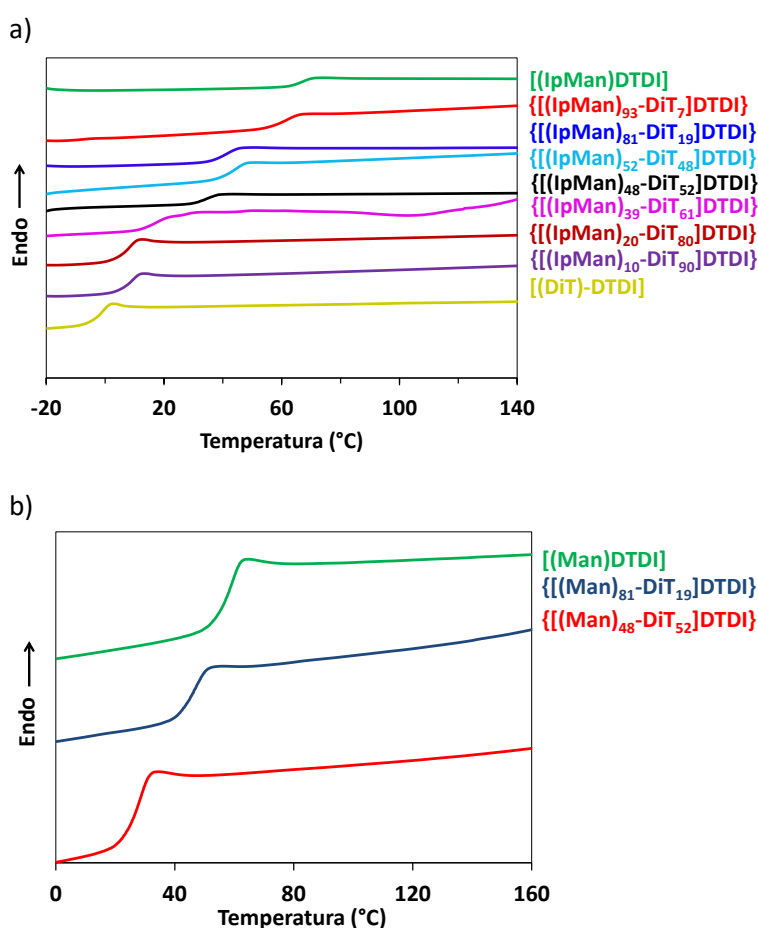


Figura 3.4. Observación de T_g . Curvas de calentamiento registradas mediante DSC de (a) PU *O*-protegidos (Serie 1); (b) PU *O*-desprotegidos (Serie 2) a partir de las muestras fundidas.

Se observó que los valores de T_g se incrementaban a medida que aumentaba el contenido de las unidades de azúcar en los coPU correspondientes. Este hecho puede explicarse como un efecto de la rigidez que los fragmentos de *O*-isopropilidén-D-manitol confieren a las cadenas poliméricas. Los homoPU [(DiT)DTDI] e [(IpMan)DTDI] presentaron valores de T_g de $-0.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $67\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Los valores de T_g de los coPU oscilaron entre $9\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $62\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sin embargo, sus correspondientes derivados polihidroxiados no protegidos (Serie 2) mostraron valores de T_g entre 8 y $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ más bajos, lo que indica que las cadenas son más flexibles (Tabla 3.5, Figura 3.4). En un trabajo previo llevado a cabo por nuestro grupo se observaron resultados similares (Begines *et al.*, 2012). La variación de los valores de T_g para las series de polímeros protegidos y desprotegidos (Series 1 y 2), representadas en función de la composición de D-manitol (IpMan y Man, respectivamente), muestra, en ambos casos, una tendencia lineal (Figura 3.5). Los termogramas de DSC de los polihidroxiuretanos, muestran que estos polímeros son materiales semicristalinos con T_m en el intervalo 75 - $122\text{ }^{\circ}\text{C}$ y T_g 59 - $13\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Tabla 3.5, Figuras 3.4 y 3.5).

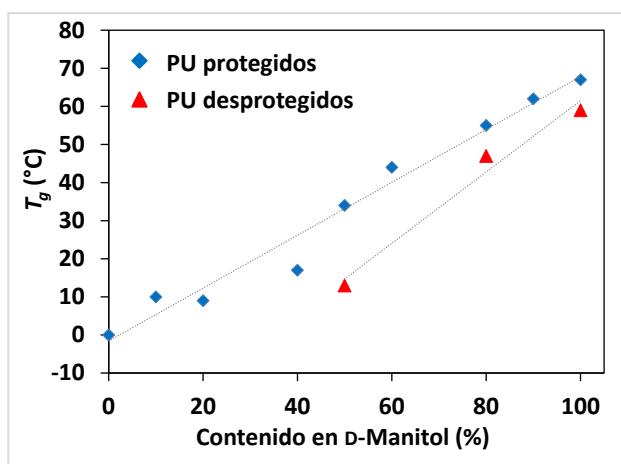


Figura 3.5. Valores de T_g en función del contenido en D-manitol.

Las curvas de TGA registradas para los PU lineales, bajo atmósfera inerte, presentaron un patrón similar de comportamiento de descomposición (Tablas 3.4 y 3.5 y Figura 3.6a). Para los PU lineales [(DlpMan-A)DTDI] y [(DlpMan-B)DTDI] la descomposición térmica tuvo lugar en una sola etapa, en el rango de temperaturas 260-280 °C y 262-275 °C, respectivamente (Tabla 3.4). La degradación máxima se observó en el rango 275-280 °C, obteniéndose en los dos casos un residuo por debajo del 9% del peso inicial (Figura 3.6). Los estudios de DSC pusieron de manifiesto la naturaleza amorfa de estos PU lineales. [(DlpMan-A)DTDI] y [(DlpMan-B)DTDI] presentaron valores de T_g de 90 y 81 °C, respectivamente (Tabla 3.4). Esta diferencia de 9 °C en la T_g se puede explicar dada la diferente rigidez proporcionada por la naturaleza de los grupos acetales de los monómeros DlpMan-A y -B. El primero de ellos posee dos anillos fusionados de 6 miembros por lo que es un monómero rígido, en cambio el monómero DlpMan-B tiene dos anillos de 5 miembros independientes que le proporcionan cierta flexibilidad. Estas características estructurales presentes en las unidades constitucionales repetitivas confieren diferente rigidez a las cadenas poliméricas.

Los estudios de TGA de los polihidroxiuretanos lineales mostraron que comenzaban a descomponerse entre 210 y 214 °C (10% de pérdida de peso) (Tabla 3.5 y Figura 3.6). La descomposición tuvo lugar en una sola etapa, con una temperatura de degradación máxima en el rango de 244-246 °C, obteniéndose un residuo por debajo del 4% del peso inicial. Por lo tanto, la degradación máxima es del orden de 16 °C inferior a la observada para el homopolímero [(Man)DTDI] parcialmente ramificado. Los polihidroxiuretanos lineales fueron materiales semicristalinos. Los estudios de DSC mostraron temperaturas de transición vítrea más bajas para los derivados polihidroxilados en comparación con sus precursores acetalizados (Tabla 3.5 y Figura 3.7). Así, las curvas de DSC de [(DlpMan-A)DTDI] y [(DlpMan-B)DTDI],

mostraron valores de T_g de 40 y 30 °C, respectivamente, lo que supone una disminución del 50% con respecto a los polímeros originales acetalizados. La diferencia observada en la T_g de ambos polihidroxiuretanos lineales se puede atribuir a los diferentes pesos moleculares de estos materiales. Los polihidroxiuretanos lineales mostraron transiciones endotérmicas de fusión y las T_m encontradas fueron mucho más altas que las de sus respectivos materiales de partida protegidos, 163 y 158 °C, respectivamente. También se observaron picos asociados a procesos de cristalización a 138 °C y 121 °C, respectivamente (Tabla 3.5).

En resumen, los PU y coPU basados en IpMan protegidos presentaron naturaleza semicristalina, excepto aquellos con mayor contenido en D-manitol que pusieron de manifiesto su naturaleza amorfa. Todos los polihidroxiuretanos resultaron ser materiales semicristalinos, con valores de T_g menores que sus materiales originales acetalizados, independientemente de la estructura ramificada o lineal. También se observó que los polihidroxiuretanos ramificados fueron menos cristalinos que los lineales, con temperaturas y entalpías de fusión menores, debido a que las ramificaciones pueden dificultar la regularidad del empaquetamiento.

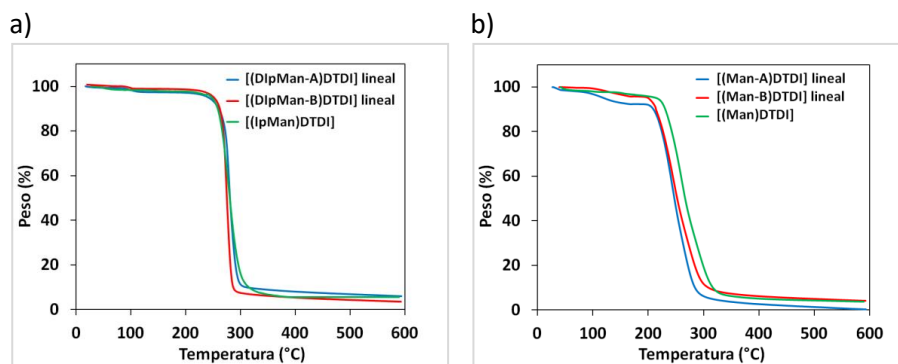


Figura 3.6. Curvas comparativas de degradación térmica (temperatura *versus* pérdidas de peso asociadas) obtenidas mediante TGA bajo atmósfera inerte de los PU (a) *O*-protegidos; (b) *O*-desprotegidos. Peso (%) *versus* temperatura (°C).

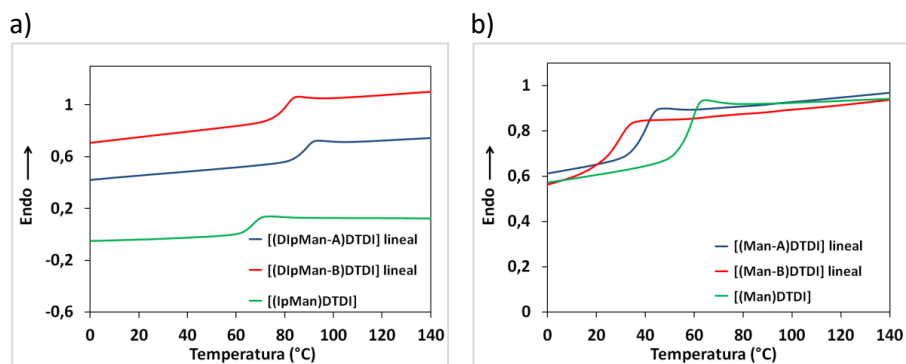


Figura 3.7. Curvas de calentamiento registradas mediante DSC de los PU (a) *O*-protegidos; (b) *O*-desprotegidos para la detección de la T_g .

Tabla 3.4. Propiedades térmicas de los homopoliuretanos PU [(IpMan)DTDI], [(DiT)DTDI] y los copoliuretanos *O*-protegidos.

Poliuretano	TGA			DSC		
	T_d^a (°C)	T_{ds}^b (°C)	ΔW^c (%)	T_g^d (°C)	T_m^e (°C)	ΔH_m^e (J g ⁻¹)
[(IpMan)DTDI]	258	279	8	67	-	-
{[(IpMan) ₉₃ -DiT ₇]DTDI}	150	266	7	62	-	-
{[(IpMan) ₈₁ -DiT ₁₉]DTDI}	226	261	8	55	70/117	3/3
{[(IpMan) ₅₂ -DiT ₄₈]DTDI}	221	234	7	44	70	41
{[(IpMan) ₄₈ -DiT ₅₂]DTDI}	254	269	8	34	68/100	4/14
{[(IpMan) ₃₉ -DiT ₆₁]DTDI}	220	240	2	19	55/89	16/11
{[(IpMan) ₂₀ -DiT ₈₀]DTDI}	232	258	4	9	56/93	32/8
{[(IpMan) ₁₀ -DiT ₉₀]DTDI}	227	245	8	10	64/100	16/28
[(DiT)-DTDI]	231	251	8	-0.8	76/109	4/51
[(DlpMan-A)DTDI] lineal	260	280	9	90		
[(DlpMan-B)DTDI] lineal	262	275	5	81		

^aTemperatura de descomposición correspondiente al 10% de pérdida de peso registrada en las curvas de TGA a 10 °C min⁻¹.

^bTemperatura de descomposición máxima.

^cPeso remanente tras la descomposición a 600 °C.

^dTemperatura de transición vítrea tomada como el punto de inflexión de las curvas de calentamiento de DSC de las muestras fundidas registradas a 20 °C min⁻¹.

^eTemperatura de fusión (T_m) sus respectivas entalpías (ΔH_m) medidas por DSC en el primer calentamiento a 10 °C min⁻¹.

Tabla 3.5. Propiedades térmicas de los polihidroxiuretanos.

Poliuretano	TGA			DSC				
	T_d^a (°C)	T_{ds}^b (°C)	ΔW^c (%)	T_g^d (°C)	T_m^e (°C)	ΔH_m^e (J g ⁻¹)	T_c^f (°C)	ΔH_c^f (J g ⁻¹)
[(Man)DTDI]	231	261	9	59	90/122	4/26		
{[(Man) ₈₁ -DiT ₁₉]DTDI}	229	266	7	47	75/115	6/12		
{[(Man) ₄₈ -DiT ₅₂]DTDI}	232	242	19	13	110	37		
[(Man-A)DTDI] lineal	210	244	0	40	163	51	138	19
[(Man-B)DTDI] lineal	214	246	4	30	158	52	121	13

^a Temperatura de descomposición correspondiente al 10% de pérdida de peso registrada en las curvas de TGA a 10 °C min⁻¹.

^b Temperatura de descomposición máxima.

^c Peso remanente tras la descomposición a 600 °C.

^d Temperatura de transición vítrea tomada como el punto de inflexión de las curvas de calentamiento de DSC de las muestras fundidas registradas a 20 °C min⁻¹.

^e Temperatura de fusión (T_m) sus respectivas entalpías (ΔH_m) medidas por DSC en el primer calentamiento a 10 °C.

^f Temperatura de cristalización (T_c) y sus respectivas entalpías (ΔH_c) medidas por DSC a velocidades de calentamiento de 10 °C min⁻¹.

3.1.5 Estudios de degradabilidad

3.1.5A Degradabilidad mediada por glutatión

Los polímeros que contienen enlaces disulfuro en las cadenas poliméricas son, probablemente, los materiales que responden a estímulos más estudiados por su potencial aplicación en sistemas de administración de fármacos, especialmente en terapias contra el cáncer. Su aplicación está condicionada por el proceso de biodegradación en los microambientes hipóxicos de las células cancerosas, donde los niveles del regulador bio-redox glutatión (tripéptido natural γ -glutatión, GSH), que es un agente reductor, son elevados. Por otro lado, se sabe que la hidrofilia favorece la degradación de los materiales que contienen enlaces disulfuro en medios acuosos, como son los medios biológicos.

En esta tesis se han llevado a cabo estudios de degradación en presencia de GSH de un conjunto de homo- y coPU seleccionados conteniendo enlaces disulfuro en las cadenas poliméricas. La degradación de los homoPU [(IpMan)DTDl] y [(DiT)DTDl] se evaluó en relación con los coPU con diferente contenido en IpMan, {[(IpMan)₈₁-DiT₁₉]DTDl} e {[(IpMan)₄₈-DiT₅₂]DTDl} (Serie 1). Paralelamente, se realizaron estudios de degradación de los correspondientes PU *O*-desprotegidos [(Man)DTDl], {[(Man)₈₁-DiT₁₉]DTDl} y {[(Man)₄₈-DiT₅₂]DTDl} (Serie 2). Dichos estudios de degradación se llevaron a cabo sobre discos preparados por compresión directa de los polímeros. Estos discos se incubaron en condiciones fisiológicas, en presencia de GSH (solución 0,1M) durante periodos de tiempo exactos hasta 28 días. El proceso de degradación se controló mediante la disminución del peso molecular por GPC y mediante la pérdida de peso del disco que las muestras experimentaron durante los períodos de incubación. Estos resultados se presentan en las Figuras 3.8 y 3.9, respectivamente. La presencia de D-manitol (tanto IpMan como Man) favoreció el proceso de degradación, debido a la naturaleza

hidrofílica de los materiales correspondientes. De hecho, la incorporación de D-manitol en las cadenas poliméricas para mejorar la biocompatibilidad y la degradabilidad de los materiales ya había sido estudiada en nuestro grupo con anterioridad (Begines *et al.*, 2012). Se observó que el homoPU [(DiT)DTDI], que no contenía manitol, apenas perdió un 2% de M_w inicial después de 28 días de incubación. Sin embargo, la tendencia cambió por completo para los materiales que contenían IpMan, especialmente para aquellos con mayor contenido en el azúcar. La disminución de M_w siguió el orden $\{[(IpMan)DTDI] > \{[(IpMan)_{81-DiT_{19}}]DTDI\} > \{[(IpMan)_{48-DiT_{52}}]DTDI\}$ (Figura 3.8). Además, se observó una pérdida de peso en el disco, hasta el 38% en el caso de $\{[(IpMan)DTDI]$ (que perdió el 28% de su M_w original tras 28 días de incubación). Los coPU $\{[(IpMan)_{81-DiT_{19}}]DTDI\}$ e $\{[(IpMan)_{48-DiT_{52}}]DTDI\}$ perdieron el 23% y el 12% de sus respectivos M_w de partida.

El estudio de degradación de los PU O-desprotegidos reveló una degradación más rápida, debido a la naturaleza hidrófila de estos materiales (Figura 3.9). La degradación mostró una tendencia con el orden $\{[(Man)DTDI] > \{[(Man)_{81-DiT_{19}}]DTDI\} > \{[(Man)_{48-DiT_{52}}]DTDI\}$, tal y como se esperaba teniendo en cuenta el contenido en D-manitol de estos materiales. Por ejemplo, tras 4 días de incubación, el M_w disminuyó en un 58%, 48% y 38%, respectivamente. Al cabo de 7 días de incubación, se observó una degradación total en cuanto al peso molecular, y una pérdida de peso de los discos recuperados de 55%, 37% y 21%, respectivamente. El hecho de que los discos de los PU más hidrofílicos (Serie 2) mostrasen la mayor pérdida de peso, podría deberse a una mayor solubilidad de sus materiales degradados en el medio acuoso de incubación.

El pequeño tamaño de la molécula de glutatión facilitó su dispersión en los discos de polímero, por lo que el efecto de la degradación apareció no solo en la superficie de los discos, sino también en su parte interna. En la Figura 3.10

se muestran micrografías de los homo- y coPU originales y al final de los períodos de incubación en presencia de GSH en condiciones fisiológicas (28 días para los protegidos y 7 días para los desprotegidos). En particular, el grosor de los discos correspondiente a $[(\text{Man})\text{DTDI}]$ y $\{[(\text{Man})_{81}\text{-DiT}_{19}]\text{DTDI}\}$ se redujo a la mitad tras la degradación, y mostraron numerosos agujeros, lo que indica que el material sufrió un ataque en profundidad. En la Figura 3.11 se presentan fotografías de los discos recuperados de $\{[(\text{Man})_{81}\text{-DiT}_{19}]\text{DTDI}\}$ después de 7 días de incubación.

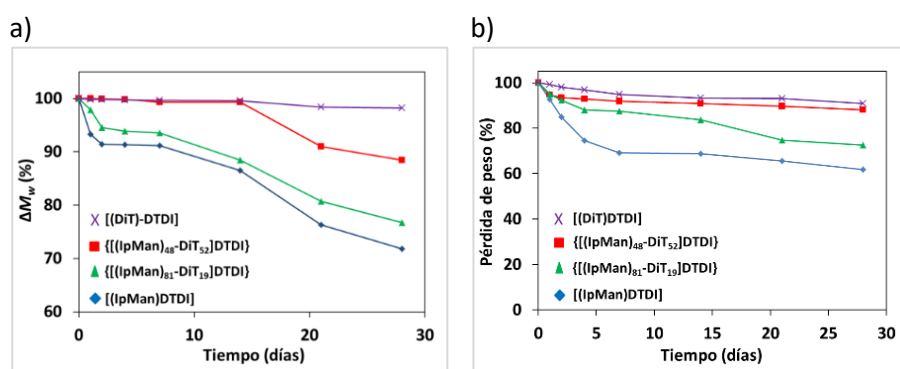


Figura 3.8. Degradación mediada por GSH de PU O-protegidos seleccionados (Serie 1). (a) Peso molecular remanente (ΔM_w); (b) Pérdida de peso frente al tiempo, incubación a 37 °C y pH 7.

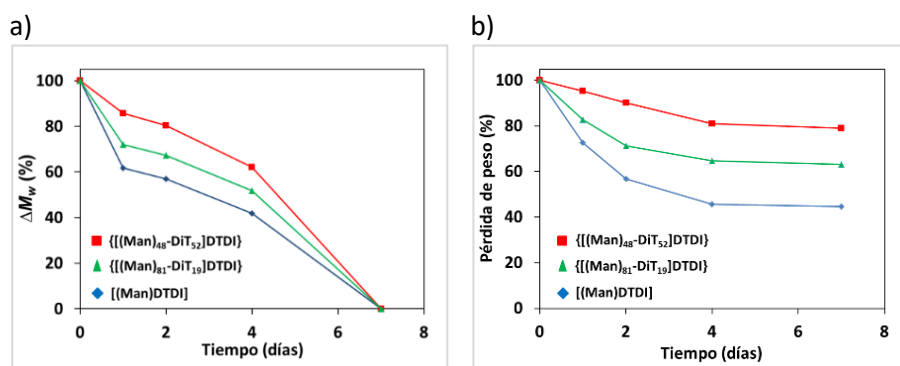


Figura 3.9. Degradación mediada por GSH de los polihidroxiuretanos seleccionados (Serie 2). (a) Peso molecular remanente (ΔM_w); (b) Pérdida de peso frente al tiempo, incubación a 37 °C y pH 7.

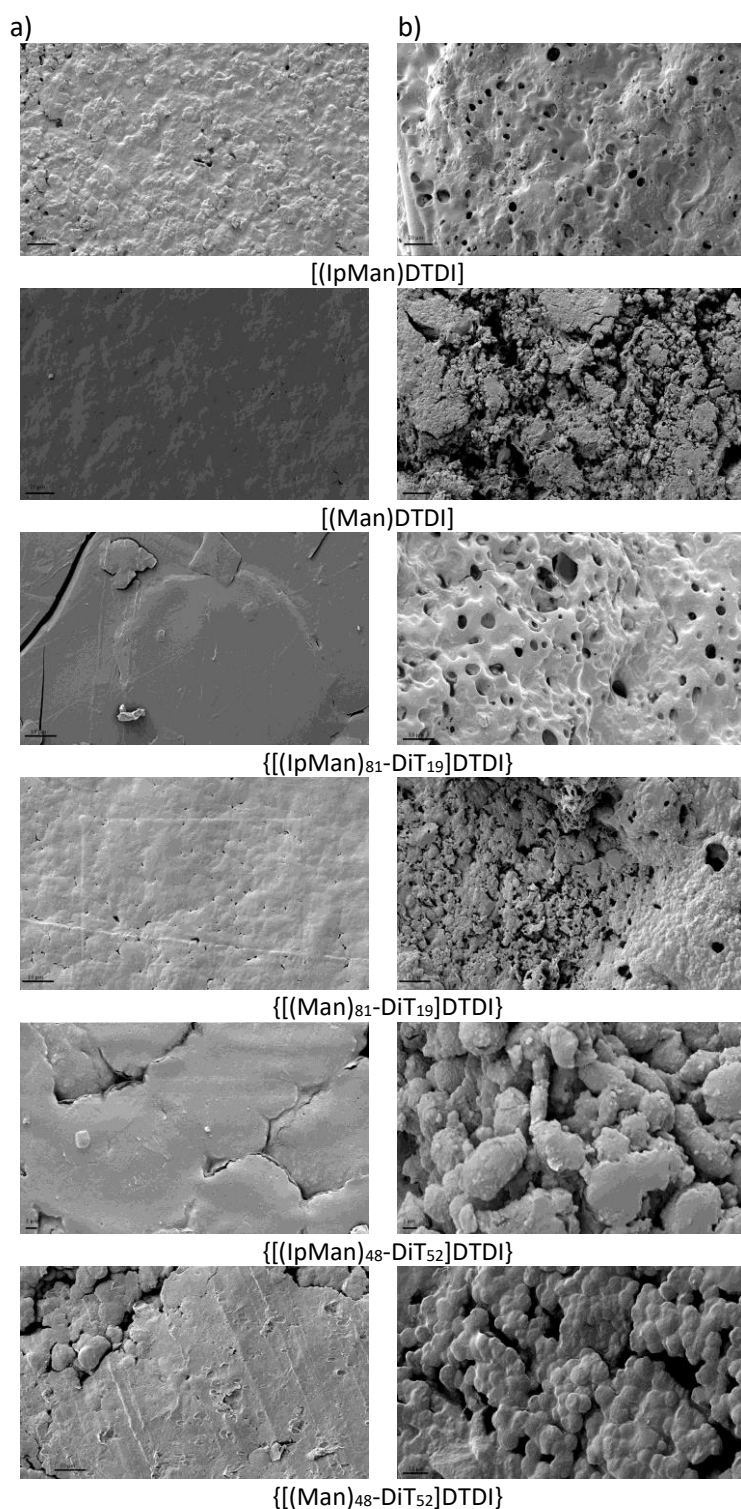


Figura 3.10. Micrografías SEM de los PU seleccionados (a) antes; b) después de la incubación: 28 días para la Serie 1 y 7 días para la Serie 2.

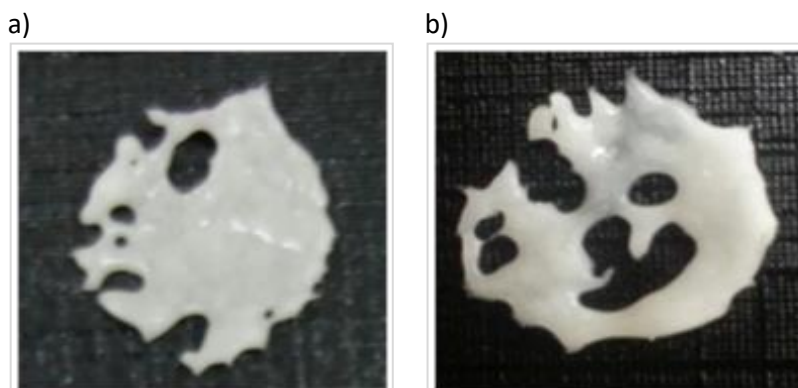


Figura 3.11. Fotografías de los discos incubados de $\{[(IpMan)_{81}-DIT_{19}]DTDI\}$ después de (a) 7 días; (b) 28 días bajo las condiciones de degradación mediadas por GSH.

A partir de los resultados anteriores, podemos afirmar que, bajo las condiciones de degradación estudiadas, el contenido en IpMan y Man en las cadenas poliméricas fue capaz de modular la respuesta del glutatión. Además, se evidenció que la hidrofilia inherente a cada material, proporcionada por el azúcar, desempeñó un papel determinante en este tipo de procesos, siendo esencial para facilitar el proceso de degradación.

3.1.5B Degradación hidrolítica

La hidrofilia también desempeña un papel muy importante en la degradación hidrolítica. La hidrofilia está íntimamente relacionada con la absorción de agua y es un parámetro clave a tener en cuenta, ya que la hidrólisis del grupo uretano es la reacción química responsable de la degradación en este tipo de polímeros (Mondal y Martin, 2012). Por esta razón, de manera paralela a la degradación mediada por GSH, se llevaron a cabo estudios de degradación hidrolítica de una selección de PU basados en

D-manitol descritos en este capítulo, bajo diferentes condiciones de pH: pH 2,00, 7,00, 8,00 y 10,00 —en adelante pH 2, 7, 8 y 10— y a una temperatura de 37 °C para simular las condiciones del tracto gastrointestinal. El proceso de degradación hidrolítica fue monitorizado por la disminución del peso molecular de los materiales correspondientes mediante GPC en períodos de tiempo exactos: 7, 14, 21, 28, 35 y 70 días.

En primer lugar, se llevó a cabo la degradación hidrolítica de los PU parcialmente ramificados basados en IpMan seleccionados: [(IpMan)DTDI], {[IpMan]₈₁-DiT₁₉]DTDI} e {[IpMan]₄₈-DiT₅₂]DTDI} y sus correspondientes derivados polihidroxilados a pH 7 y 37 °C durante 70 días. El proceso de degradación se muestra en la Figura 3.12, donde el peso molecular remanente (ΔM_w) se representa frente al tiempo de incubación. Se puede observar cómo el grado de degradación aumenta con el contenido de D-manitol, tanto IpMan como Man, especialmente con Man. De hecho, el homopolímero [(IpMan)DTDI] perdió aproximadamente el 20% de su M_w original tras 28 días de incubación, mientras que su derivado polihidroxilado [(Man)DTDI] presentó una pérdida del 66% en ese mismo tiempo. Después de 70 días de incubación, habían perdido aproximadamente el 55% y 76% de M_w , respectivamente.

Paralelamente, estos mismos polímeros se sometieron a degradación a pH 2, pH 8 y pH 10 a 37 °C durante 28 días. Los resultados se muestran en la Figura 3.13. Una vez más, los materiales que se degradaron en mayor grado, en cualquier rango de pH, fueron aquellos con mayor contenido en azúcar en sus cadenas poliméricas. Estos PU fueron los más hidrofílicos y, por tanto, los más rápidos en degradarse. Como era de esperar, todos los PU se degradaron en mayor extensión a pH básico. Por ejemplo, [(Man)DTDI] con el contenido más alto en D-manitol perdió solamente un 13,4% de M_w a pH 2. En cambio, [(IpMan)DTDI] e {[IpMan]₈₁-DiT₁₉]DTDI} perdieron aproximadamente un 27-

30% de M_w a pH 8, y un 35% de pérdida de M_w a pH 10. Los correspondientes derivados polihidroxilados presentaron un patrón similar de pérdida de M_w , disminuyendo un 28-36% a pH 8, y un 38-41% a pH 10. Vale la pena señalar que este conjunto de PU y coPU basados en IpMan y sus derivados polihidroxilados resultaron ser muy higroscópicos, como se indica en la Sección 3.1.3, lo que favoreció el curso de la degradación hidrolítica (Mondal y Martin, 2012).

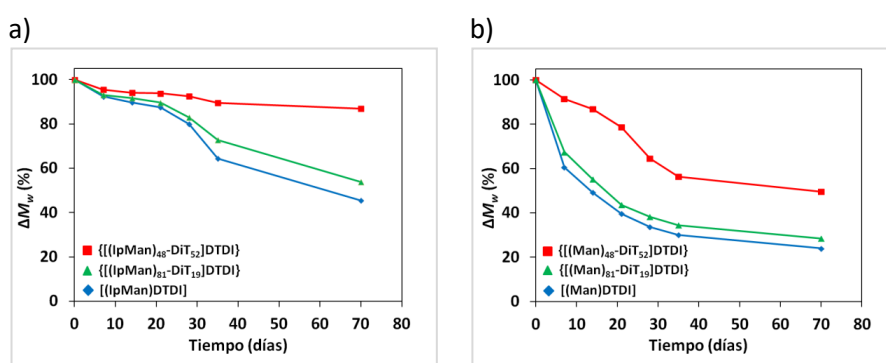


Figura 3.12. Degradación hidrolítica de (a) $\{[(IpMan)_x-DiT_y]DTDI\}$ e $[(IpMan)DTDI]$; (b) polihidroxipoliuretanos $\{[(Man)_x-DiT_y]DTDI\}$ y $[(Man)DTDI]$. El peso molecular remanente (ΔM_w) se representa frente al tiempo de incubación a 37 °C, pH 7 durante 70 días.

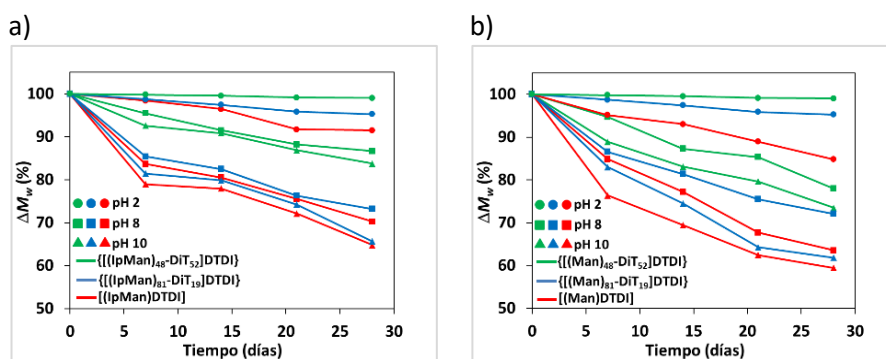


Figura 3.13. Degradación hidrolítica de (a) $\{[(IpMan)_x-DiT_y]DTDI\}$ e $[(IpMan)DTDI]$; (b) polihidroxipoliuretanos $\{[(Man)_x-DiT_y]DTDI\}$ y $[(Man)DTDI]$. El peso molecular remanente (ΔM_w) se representa frente al tiempo de incubación a 37 °C y diferentes pH durante 28 días.

Por otro lado, los homopoliuretanos lineales [(DlpMan-A)DTDI] y [(DlpMan-B)DTDI], así como sus correspondientes derivados *O*-desprotegidos presentaron el mismo perfil de degradación pero en menor extensión que sus homólogos no lineales (Figuras 3.14 y 3.15). En general, aquellos PU con mayor contenido en D-manitol (especialmente en Man) perdieron hasta un 20-25% de su M_w original después de ser incubados a pH 10 durante 28 días. Las diferencias en higroscopicidad y cristalinidad de los polihidroxietanatos no lineales y lineales podría explicar que los primeros se degradasen en mayor extensión, ya que fueron más higroscópicos y menos cristalinos.

En las Figuras 3.16 y 3.17 se muestran micrografías SEM del homoPU parcialmente ramificado [(Man)DTDI] y sus homólogos lineales [(Man-A)DTDI] y [(Man-B)DTDI] antes y después de los procesos de incubación. Se puede observar cómo la erosión ocurre en la superficie de los discos estudiados, mostrando un proceso de degradación superficial.

Se puede concluir diciendo que para la degradación hidrolítica en el rango de pH 2-10, la presencia de unidades de D-manitol en las cadenas poliméricas es de crucial importancia, ya que asegura el proceso de degradación. Características estructurales como linealidad o ramificaciones entre las cadenas poliméricas, así como la presencia de grupos hidroxilo a lo largo de ellas, son las responsables del éxito del proceso. Como se indicó anteriormente, los PU basados en IpMan se degradaron hidrolíticamente en mayor extensión debido a que presentaron cierto grado de ramificación, menor cristalinidad y mayor higroscopicidad. En general, todos los PU polihidroxilados estudiados mostraron bajos valores de T_g lo que, junto con las propiedades mencionadas, favorecieron cualquier tipo de proceso de degradación en comparación con los materiales de partida acetalizados.

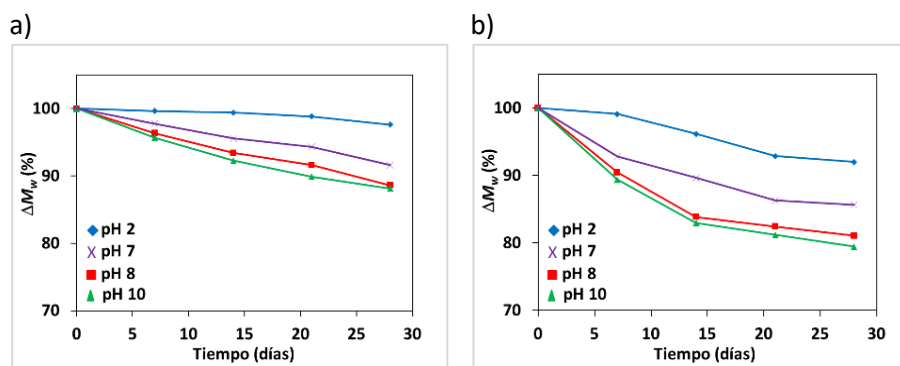


Figura 3.14. Degradación hidrolítica de (a) [(DlpMan-A)DTDI]; (b) [(Man-A)DTDI] lineales. El peso molecular remanente (ΔM_w) se representa frente al tiempo de incubación a 37 °C y diferentes pH durante 28 días.

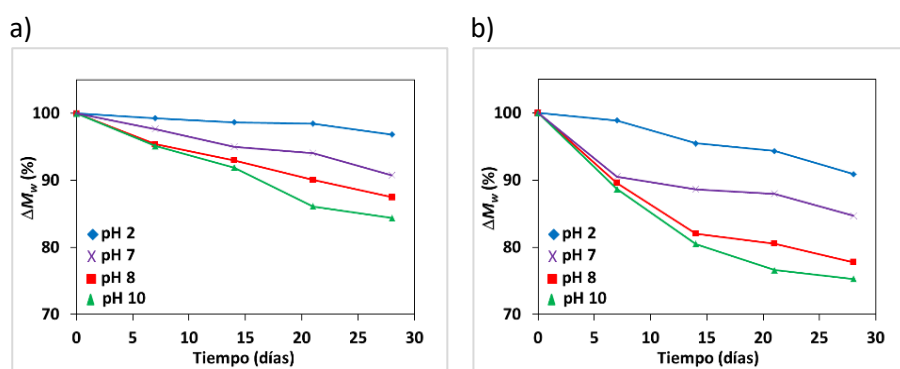


Figura 3.15. Degradación hidrolítica de (a) [(DlpMan-B)DTDI]; (b) [(Man-B)DTDI] lineales. El peso molecular remanente (ΔM_w) se representa frente al tiempo de incubación a 37 °C y diferentes pH durante 28 días.

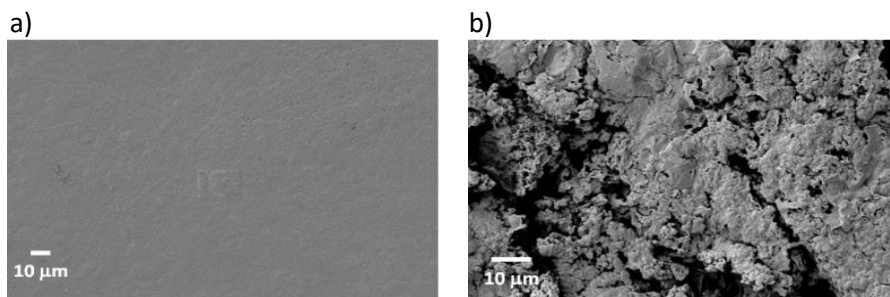


Figura 3.16. Micrografías SEM de [(Man)DTDI] (a) antes; (b) después de la incubación a 37 °C, pH 7, 70 días.

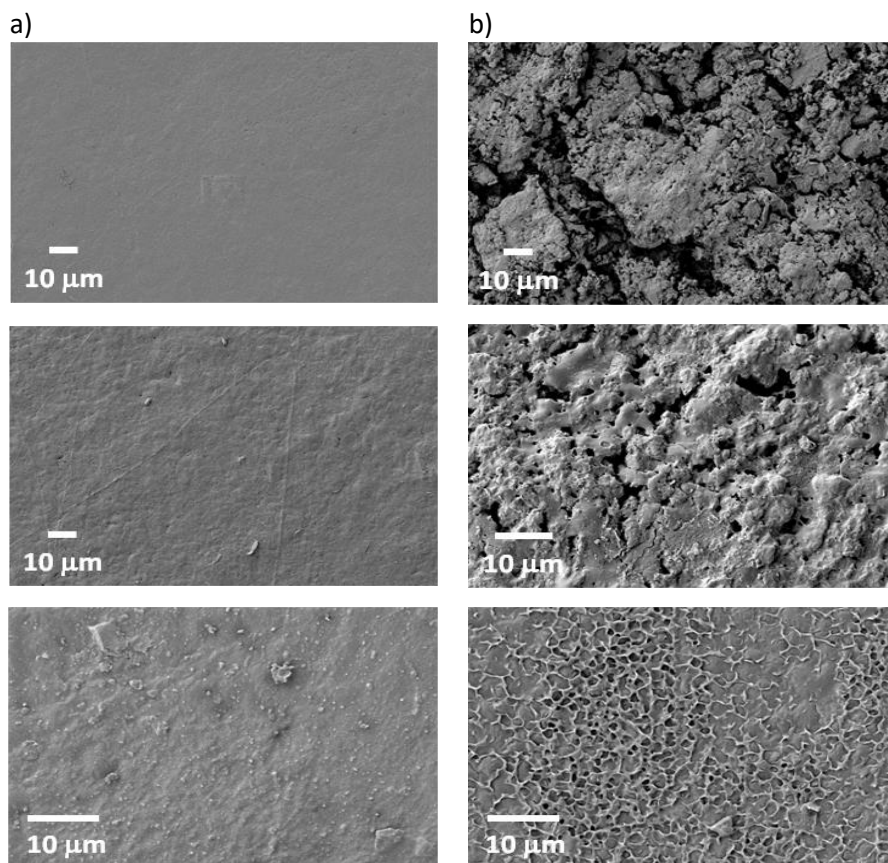


Figura 3.17. Micrografías SEM de [(Man)DTDI] (arriba), [(Man-A)DTDI] lineal (centro) y [(Man-B)DTDI] lineal (abajo) (a) antes y (b) después de la incubación a 37 °C, pH 10, 28 días.

3.1.6 Estudios de liberación controlada de fármacos

La evaluación de la capacidad de algunos de los poliuretanos sintetizados en esta tesis como excipientes formadores de matrices en sistemas de liberación controlada de fármacos, se llevó a cabo en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, en el grupo de investigación del Prof. Isidoro Caraballo.

Se eligieron los homoPU [(DiT)DTDI] e [(IpMan)DTDI] y las matrices fueron preparadas por compresión directa conteniendo entre un 10 y un 30% p/p de los polímeros estudiados y teofilina anhidra como fármaco modelo. Los estudios se llevaron a cabo simulando las condiciones del tracto gastrointestinal, para lo que se utilizaron disoluciones de diferentes pH, en presencia de glutatión y atmosfera de argón para crear el ambiente reductor característico del colon. Los detalles sobre las fases gastrointestinales simuladas se describen en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6. Especificaciones de las cuatro fases de los ensayos de disolución *in vitro*.

Fase	Segmento gastrointestinal	Tiempo (min)	pH
I	Estómago	0-120	1,2
II	Yeyuno	120-240	6,8
III	Íleon (distal)	240-270	7,5
IV	Colon (proximal)	270-720	6,0

Los polímeros estudiados presentaron índices de compresión adecuados, por encima de los valores considerados como apropiados para la compresión directa, incluso sin adición de agentes mejoradores de flujo. Los valores obtenidos para elucidar la eficacia como excipientes mostraron una buena capacidad de los polímeros para controlar la liberación del fármaco.

Los perfiles obtenidos de los ensayos de disolución de los polímeros [(DiT)DTDI] e [(IpMan)DTDI] se muestran en las Figuras 3.18 y 3.19, respectivamente. La capacidad de ambos polímeros para controlar la liberación del fármaco se refleja en la disminución sustancial de la liberación del fármaco causada por el aumento en la concentración de polímero, que fue

mucho más notable en el PU [(DiT)DTDI]. Por ejemplo, en los lotes preparados con un 10% del polímero [(DiT)DTDI] se liberó en torno al 95% de teofilina a las 6 h, mientras que los lotes preparados con 30% de polímero liberaron aproximadamente un 55% de teofilina tras el mismo tiempo (Figura 3.18). Sin embargo, [(IpMan)DTDI] mostró un perfil de liberación más rápido que el que presentó [(DiT)DTDI] (Figura 3.19).

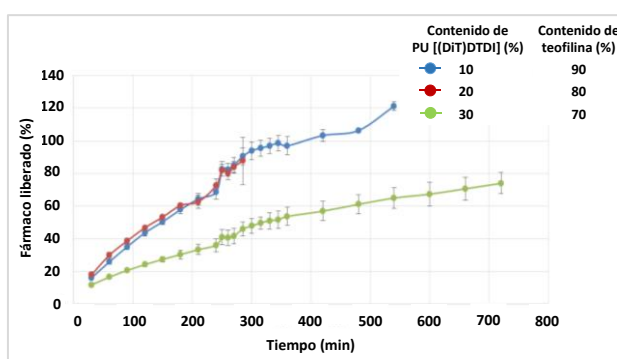


Figura 3.18. Perfiles de disolución preparados con 10%, 20% y 30% de PU [(DiT)DTDI]. Fármaco liberado (%) versus tiempo (min).

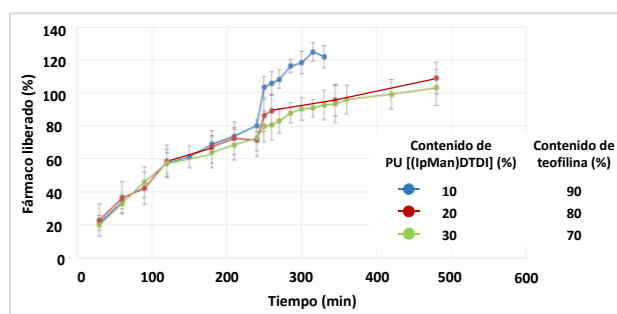


Figura 3.19. Perfiles de disolución preparados con 10%, 20% y 30% de PU [(IpMan)DTDI] de M_w 40.000 g mol⁻¹. Fármaco liberado (%) versus tiempo (min).

Por otro lado, se estudió la influencia del peso molecular de los polímeros en la velocidad de liberación. Para ello se preparó un segundo lote de [(IpMan)DTDl] con un peso molecular M_w de 90.000 g mol⁻¹. Se prepararon lotes de comprimidos con concentraciones del 10%, 20% y 30% p/p con teofilina y se llevaron a cabo los ensayos en las mismas condiciones anteriores. Aunque generalmente, un mayor peso molecular en los excipientes se asocia a una liberación más lenta del fármaco, los resultados obtenidos no mostraron una influencia significativa del peso molecular en los perfiles de liberación (Figura 3.20). Este efecto podría ser debido a otros factores inherentes a la formulación, por ejemplo, propiedades reológicas, compatibilidad entre el excipiente y el fármaco, compresibilidad o la distribución de las partículas dentro de la matriz.

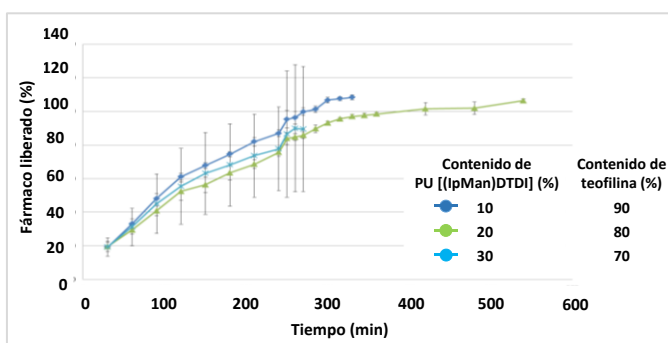


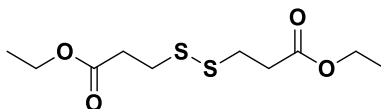
Figura 3.20. Perfiles de disolución preparados con 10%, 20% y 30% de PU [(IpMan)DTDl] de M_w 90.000 g mol⁻¹. Fármaco liberado (%) *versus* tiempo (min).

Se puede concluir que los poliuretanos [(DiT)DTDl] e [(IpMan)DTDl] mostraron un aumento de la liberación de teofilina cuando entraron en la fase de simulación de colon, lo que se puede atribuir a la degradación de los enlaces disulfuro en el ambiente reductor. Este efecto fue más evidente para [(DiT)DTDl] por lo que puede ser considerado como candidato potencial en el desarrollo de sistemas de administración de fármacos a nivel colónico.

3.1.7 Parte experimental

3.1.7A Monómeros

3,3'-ditiopropionato de dietilo (2)

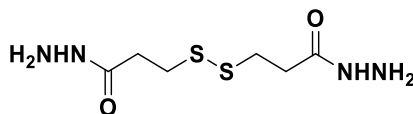


El ácido 3,3'-ditiopropiónico (**1**) (10 g, 47,6 mmol) se introdujo en un matraz y se adicionaron 30 mL de etanol, 30 mL de tolueno y 0,17 mL de ácido sulfúrico. La mezcla de reacción se agitó a reflujo con una trampa Dean Stark durante 15 h. Pasado este tiempo, se concentró a sequedad, el residuo obtenido se disolvió en CH_2Cl_2 y se evaporó. El residuo resultante se disolvió en dietil éter y la disolución se lavó tres veces con 20-30 mL de agua hasta pH neutro. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a sequedad para dar el producto **2** como un líquido incoloro (11,5 g, Rto. 91%) (Teramura *et al*, 2007).

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ (ppm) 1,28 (t, 6H, $J = 7,1$ Hz, CH_3), 2,73 (t, 4H, $J = 7,1$ Hz, COCH_2), 2,94 (t, 4H, $J = 7,0$ Hz, SCH_2), 4,17 (c, 4H, $J = 7,1$ Hz, OCH_2).

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ (ppm) 14,2 (CH_3), 33,2 (SCH_2), 34,1 (COCH_2), 60,7 (OCH_2), 171,6 (CO).

3,3'-disulfaneditiildi(propanohidrazida) (3)



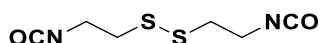
A una disolución de **2** (5,69 g, 21,4 mmol) en 8 mL de metanol se le añadió una disolución acuosa al 65% de hidrazina monohidrato (10,23 mL, 137 mmol)

y la mezcla se agitó durante una hora a temperatura ambiente. La suspensión obtenida se filtró, se lavó con metanol y el sólido filtrado se recrystalizó de metanol para dar lugar al producto **3** como un sólido blanco (3,7 g, 72%), p.f. 130-131 °C. [Lit. 125-126 °C (Vercruysse *et al.*, 1997)].

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ (ppm) 2,60 (t, 4H, $J = 6,9$ Hz, COCH_2), 2,90 (t, 4H, $J = 6,9$ Hz SCH_2), 4,60 (sa, 6H, NH, NH_2).

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ (ppm) 35,6, 35,7 (CH_2), 175,6 (CO).

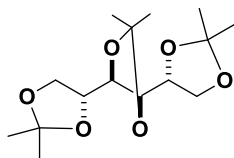
2,2'-ditiodietildiisocianato (DTDI)



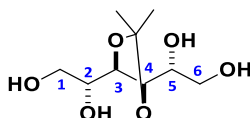
Una disolución del compuesto **3** (4,16 g, 17,5 mmol) en una mezcla de ácido clorhídrico y agua (3,3 mL de HCl concentrado y 16,2 mL de agua) se agitó en un baño de hielo durante cinco minutos. A continuación, se adicionó gota a gota una disolución de nitrito de sodio (2,4 g, 34,8 mmol) en agua (3,4 mL) y 35 mL de tolueno. La agitación se mantuvo a 5 °C durante 30 minutos y la suspensión resultante se filtró. La fase orgánica se separó, se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró. El filtrado se calentó a reflujo durante 30 minutos. Finalmente, la disolución se concentró a sequedad obteniéndose DTDI como un líquido amarillento (3,2 g, Rto. 90%) (Teramura *et al.*, 2007).

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ (ppm) 2,90 (t, 4H, $J = 6,3$ Hz, SCH_2), 3,64 (t, 4H, $J = 6,3$ Hz, OCNCH_2).

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ (ppm) 39,7 (SCH_2), 41,6 (OCNCH_2), 123,6 (NCO).

1,2:3,4:5,6-tri-*O*-isopropilidén-D-manitol (5)

A una suspensión de D-manitol (40 g, 0,21 moles) en 500 mL de acetona se le añadieron 4 mL de ácido sulfúrico concentrado y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. La disolución resultante se neutralizó por adición gota a gota de una disolución de sosa concentrada hasta pH neutro. Las sales formadas se filtraron y la disolución resultante se concentró a un tercio de su volumen original. A continuación, se diluyó al doble con agua dando lugar a una cristalización en masa, obteniéndose **5** (44 g, 66%) que se utilizó en la siguiente etapa sin previa purificación. Sus características físicas fueron idénticas a las descritas en la literatura para este compuesto, p.f. 66-67 °C. [Lit. 69-70 °C (Wiggins, 1946)].

3,4-*O*-isopropilidén-D-manitol (IpMan)

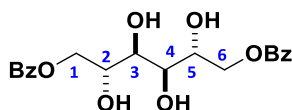
Una disolución del compuesto **5** (20 g, 66 mmol) en 400 mL de ácido acético al 70% se calentó durante 90 minutos a 40 °C. La disolución obtenida se concentró a sequedad a 40-50 °C y el residuo aceitoso obtenido se trató con acetona. La evaporación de la disolución acetónica dio lugar a un aceite incoloro cromatográficamente puro que cristalizó espontáneamente. Finalmente, se recrystalizó de una disolución concentrada de acetona hirviendo

a la que se le añadió hexano hasta turbidez (13,4 g, Rto. 91%). Las características físicas fueron idénticas a las descritas en la literatura para IpMan, p.f. 89-90 °C. [Lit. 86-87 °C (Wiggins, 1946)].

^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz): δ (ppm) 1,28 (s, 6H, CH_3), 3,32-3,39 (m, 4H, , H-1_{a/b}, H-6_{a/b}), 4,45-3,59 (m, 2H, H-2, H-5), 3,86 (dd, 2H, $J = 4,8$ y $1,5$ Hz, H-3, H-4), 4,45 (t, 2H, $J = 5,4$ Hz, CH_2OH), 5,06 (sa, 2H, CHOH).

^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 75 MHz): δ (ppm) 27,2 (CH_3), 62,9 (C-1, C-6), 72,82 (C-2, C-3), 79,0 (C-4, C-5), 108,2 [$\text{C}(\text{CH}_3)_2$].

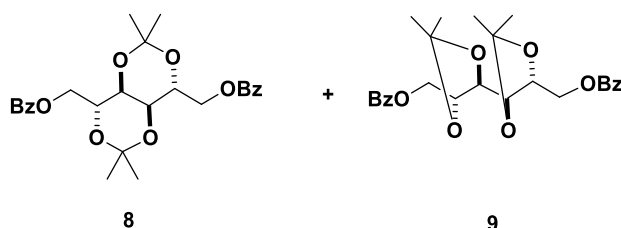
1,6-di-*O*-benzoil-D-manitol (7)



A una suspensión de D-manitol (30 g, 0,16 mol) en piridina seca (80 mL), enfriada en baño de hielo, se le adicionó gota a gota una disolución de cloruro de benzoílo (46,3 g, 0,33 mol) en piridina seca (66 mL) durante 1 hora. Finalizada la adición, se mantuvo la agitación durante 5 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se vertió sobre agua con hielo (1,5 L). El sólido precipitado se filtró, se lavó con agua fría y cloroformo, se secó y se recristalizó del etanol (21,3 g, 36%). Las características físicas fueron idénticas a las descritas en la literatura para este compuesto, p.f. 191-193 °C. [Lit. 189-193 °C (Begines *et al.*, 2012).

IR: ν_{max} (cm^{-1}) 3504 (O-H), 1693 (C=C arom.), 1285, 1027 (C-O-C).

1,6-di-*O*-benzoil-2,4:3,5-di-*O*-isopropilidén-D-manitol (8) y 1,6-di-*O*-benzoil-2,3:4,5-di-*O*-isopropilidén-D-manitol (9)



Una mezcla de 1,6-di-*O*-benzoil-D-manitol (**7**) (14,3 g, 36,7 mmol), 2,2-dimetoxipropano (91 mL) y ácido *p*-toluensulfónico monohidrato (151,3 mg, 0,8 mmol) se calentó durante 1 hora a reflujo. Posteriormente, la mezcla de reacción se trató con 90 mL de una disolución saturada de Na₂CO₃ y se extrajo con TBME (2 x 90 mL). Los extractos orgánicos reunidos se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a sequedad para obtener un aceite incoloro que se sometió a cromatografía en columna, utilizando CH₂Cl₂ como eluyente, para proporcionar una mezcla de los compuestos **8** y **9** como un aceite incoloro (17 g, Rto. 99%), cuyas características físicas fueron idénticas a las descritas en la literatura (Gawronska, 1988).

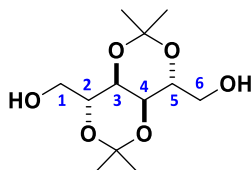
IR: ν_{\max} (cm⁻¹) 1717 (C=C arom.), 1268, 1026 (C-O-C).

2,4:3,5-di-*O*-isopropilidén-D-manitol (DlpMan-A) y 2,3:4,5-di-*O*-isopropilidén-D-manitol (DlpMan-B)

A una disolución de la mezcla de **8** y **9** (7,6 g, 16,2 mmol) en una mezcla de CHCl₃ y MeOH 10:1 (110 mL) se le añadió una disolución 1M MeONa en MeOH (18,3 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se concentró a sequedad y se lavó con hexano. Finalmente, el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla de MeOH en CH₂Cl₂ de 0 a 2%

para dar los productos DlpMan-A (1,5 g, Rto. 35%) y DlpMan-B (1,4 g, Rto. 32%) como sólidos blancos cuyas características físicas fueron idénticas a las descritas en la literatura.

DlpMan-A



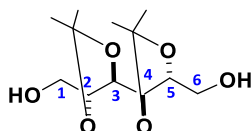
P.f. 136-137 °C [Lit. 134-135 °C (Gawronska, 1988)].

IR: ν_{\max} (cm⁻¹) 3288 (OH), 1214, 1026 (C-O-C).

¹H RMN (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ (ppm) 1,22, 1,28 [2s, 12H, 2 C(CH₃)₂], 3,33-3,48 (m, 4H, H-1_{a/b}, H-6_{a/b}), 3,49-3,57 (m, 2H, H-3, H-4), 3,66-3,76 (m, 2H, H-2, H-5), 4,66-4,73 (t, 2H, *J* = 5,73 Hz, 2 OH).

¹³C{¹H}-RMN (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ (ppm) 24,3, 24,9 [2 C(CH₃)₂], 62,0 (C-1, C-6), 67,9 (C-2, C-5), 71,5 (C-3, C-4), 100,4 [2 C(CH₃)₂].

DlpMan-B



P.f. 94-96 °C [Lit. 93-95 °C (Gawronska, 1988)].

IR: ν_{\max} (cm⁻¹) 3405 (OH), 1213, 1044 (C-O-C).

¹H RMN (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ (ppm): 1,26, 1,36 (2s, 12H, 2 [C(CH₃)₂]), 3,38-3,46 (m, 2H, H-1_a, H-6_a), 3,47-3,55 (m, 2H, H-1_b, H-6_b), 4,08-4,16 (m, 2H, H-3, H-4), 4,17-4,24 (m, 2H, H-2, H-5), 4,63-4,71 (m, 2H, 2 OH).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ (ppm) 25,6, 27,5 [2 C(CH $_3$) $_2$], 60,6 (C-1, C-6), 74,5 (C-2, C-5), 77,4 (C-3, C-4), 107,3 [2 C(CH $_3$) $_2$].

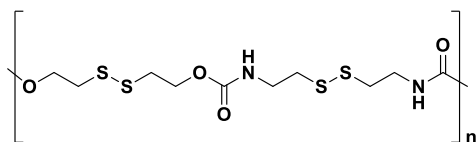
3.1.7B Poliuretanos

3.1.7B1 Procedimiento general para la síntesis de homo- y copoliuretanos

En un matraz de fondo redondo se introdujeron 4 mmoles de los correspondientes dioles IpMan y/o DiT en sus respectivas relaciones molares. El sistema se trató con tres ciclos de vacío-argón antes de la adición de THF seco (4 mL). La mezcla se agitó hasta obtener una disolución homogénea y le se añadió el diisocianato DTDI (4 mmol) bajo atmósfera de argón, seguido de una gota de catalizador [dilaurato de dibutilestano (II)]. La agitación se continuó a temperatura ambiente durante 24 h. Finalmente, la mezcla de reacción se trató con alcohol *terc*-butílico (1,2 mL) durante 30 minutos y se precipitó gota a gota sobre dietil éter frío (200 mL). El polímero precipitado se filtró, se lavó con éter dietílico, y se secó a vacío a 40 °C durante 24 h para dar lugar a materiales sólidos blancos.

3.1.7B2 Datos espectroscópicos de poliuretanos

HomoPU [(DiT)DTDl]

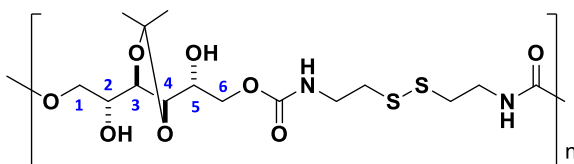


IR: ν_{max} (cm $^{-1}$) 3341 (N-H), 1682 (C=O), 1529 (N-H), 1248 (N-CO-O).

^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz): δ (ppm) 2,76-2,84 (m, 4H, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ y $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ terminal), 2,93-2,99 (m, 4H, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3,28 (c, 4H, $J = 6,3$ Hz, CH_2NH), 3,64 (c, $J = 6,2$ Hz, terminal CH_2OH), 4,20 (t, 4H, $J = 6,0$ Hz, CH_2O), 4,86 (t, $J = 5,4$ Hz, CH_2OH terminal), 7,35 (sa, 2H, NH).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz): δ (ppm) 37,0 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 37,4 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 39,7 (CH_2NH), 41,1 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ terminal), 59,4 (CH_2OH terminal), 61,8 (CH_2O), 155,9 (CO).

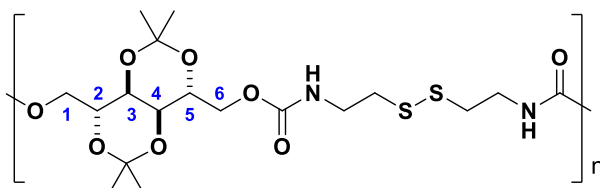
HomoPU [(IpMan)DTDI]



IR: ν_{max} (cm^{-1}) 3320 (N-H, O-H), 1693 (C=O), 1525 (N-H), 1250 (N-CO-O).

^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz), δ (ppm): 1,31 (s, 6H, CH_3), 2,70-2,84 (m, 4H, CH_2S), 3,20-3,30 (m, 4H, CH_2NH), 3,42-3,63 (m, H-1_{a/b} *ram*, H-6_{a/b} *ram* y H-1_{a/b}, H-2, H-5, H-6_{a/b} terminal), 3,64-3,74 (m, 2H, H-2, H-5), 3,81-3,96 (m, 4H, H-1_a, H-3, H-4, H-6_a), 4,09-4,18 (m, 2H, H-1_b, H-6_b, H-3 *ram*, H-4 *ram*), 4,40-5,30 (varios m, OH, H-2 *ram*, H-5 *ram*), 7,26 (sa, 2H, NH).

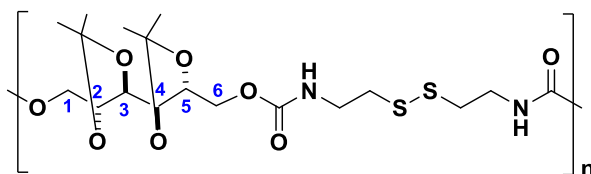
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz), δ (ppm): 27,2 (CH_3), 27,3 (CH_3 *ram*), 37,4 (CH_2S), 39,6 (CH_2NH), 59,7 (C-1, C-6 terminal), 63,1 (C-1 *ram*, C-6 *ram*) 65,8 (C-1, C-6), 70,0 (C-2, C-5), 72,8 (C-2, C-5 terminal), 74,3 (C-2 *ram*, C-5 *ram*), 78,9 (C-3 *ram*, C-4 *ram*), 79,2 (C-3, C-4), 108,6, 108,9 [$\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 155,8, 156,3 (CO).

HomoPU [(DIpMan-A)DTDI] lineal

IR: ν_{\max} (cm^{-1}) 1698 (C=O), 1524 (N-H), 1217 (N-CO-O).

^1H RMN (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ (ppm) 1.22, 1.28 [2s, 12H, 2 C(CH₃)₂], 2.69-2.82 (m, 4H, 2 CH₂S), 3.19-3.30 (m, 4H, 2 CH₂NH), 3.68-3.77 (m, 2H, H-3, H-4), 3.78-3.83 (m, 2H, H-2, H-5), 3.96-4.14 (m, 4H, H-1_{a/b}, H-6_{a/b}), 7.36 (sa, 2H, 2 NH).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN (DMSO- d_6 , 125 MHz), δ (ppm): 23,6, 24,4 [2 C(CH₃)₂], 37,5 (CH₂S), 39,7 (CH₂NH), 63,7 (C-1, C-6), 67,5 (C-2, C-5), 68,0 (C-3, C-4), 100,5 [C(CH₃)₂], 156,0 (CO).

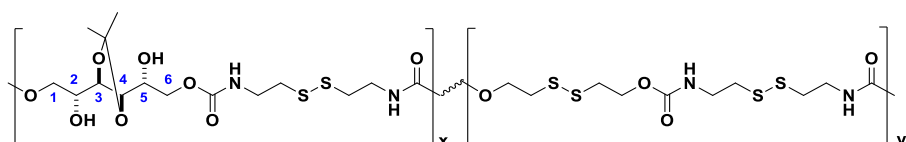
HomoPU [(DIpMan-B)DTDI] lineal

IR: ν_{\max} (cm^{-1}) 1699 (C=O), 1523 (N-H), 1216 (N-CO-O).

^1H RMN (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ (ppm) 1.28, 1.39 [2s, 12H, 2 C(CH₃)₂], 2.69-2.82 (m, 4H, 2 CH₂S), 3.19-3.38 (m, 4H, 2 CH₂NH), 3.95-4.04 (m, 2H, H-1_a, H-6_a), 4.11-4.19 (m, 2H, H-1_b, H-6_b), 4.19-4.27 (m, 2H, H-2, H-5), 4.28-4.37 (m, 2H, H-3, H-4), 7.37 (sa, 2H, NH).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ (ppm) 25,2, 27,0 [2 C(CH $_3$) $_2$], 37,4 (CH $_2$ S), 39,9 (CH $_2$ NH), 63,5 (C-1, C-6), 74,1 (C-2, C-5), 74,8 (C-3, C-4), 108,1 [2 C(CH $_3$) $_2$], 155,9 (CO).

CoPU {[(IpMan) $_x$ -DiT $_y$]DTDI}



CoPU {[(IpMan) $_{93}$ -DiT $_7$]DTDI}

IR: ν_{max} (cm $^{-1}$) 3319 (OH, NH), 1695 (C=O), 1530 (N-H), 1250 (N-CO-O).

^1H RMN (DMSO- d_6 , 500 MHz), δ (ppm): 1,30 (s, 11, 2H, CH $_3$), 2,68-2,84 (m, 8H, SCH $_2$ CH $_2$ NH y SCH $_2$ CH $_2$ OH terminal), 2,90-2,99 (m, 0,6H, SCH $_2$ CH $_2$ O), 3,15-3,30 (m, 8H, CH $_2$ NH), 3,43-3,77 (m, 3,7H, H-2, H-5, H-1 $_{a/b}$ ram, H-6 $_{a/b}$ ram y H-1 $_{a/b}$, H-6 $_{a/b}$ terminal), 3,79-3,97 (m, 7,4H, H-1 $_a$, H-3, H-4, H-6 $_a$), 4,07-4,28 (m, 4,3H, SCH $_2$ CH $_2$ O, H-1 $_b$, H-6 $_b$), 4,40-5,44 (varios s, 3,7H, OH y H-2 ram, H-5 ram), 7,25 (sa, 3,7H, IpMan-OCONH), 7,39 (sa, 0,3H, NH).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN (DMSO- d_6 , 125 MHz), δ (ppm): 27,3 (CH $_3$), 37,0 (OCH $_2$ CH $_2$ S), 37,4 (HNCH $_2$ CH $_2$ S), 39,7 (HNCH $_2$ CH $_2$ S), 59,7 (C-1, C-6 terminal), 61,8 (OCH $_2$ CH $_2$ S), 63,0, 65,4 (C-1, C-6 ram), 65,8 (C-1, C-6), 70,0 (C-2, C-5), 72,6 (C-2, C-5 ram), 78,6 (C-3, C-4 ram), 79,2 (C-3, C-4), 108,9, 109,4 [C(CH $_3$) $_2$], 155,9, 156,3 (CO).

CoPU {[IpMan]₈₁-DiT₁₉]DTDI}

IR: ν_{\max} (cm⁻¹) 3338 (OH, NH), 1693 (C=O), 1530 (N-H), 1252 (N-CO-O).

¹H RMN (DMSO-*d*₆, 500 MHz), δ (ppm): 1,31 (s, 9,7H, CH₃), 2,73-2,85 (m, 8H, SCH₂CH₂NH y terminal SCH₂CH₂OH), 2,93-3,01 (m, 1,5H, SCH₂CH₂O), 3,23-3,31 (m, 8H, CH₂NH), 3,45-3,78 (m, 3,2H, H-2, H-5, H-1_{a/b} *ram*, H-6_{a/b} *ram* y SCH₂CH₂OH terminal, H-1_{a/b}, H-6_{a/b}), 3,82-3,97 (m, 6,5H, H-1_a, H-3, H-4, H-6_a), 4,08-4,28 (m, 4,8H, SCH₂CH₂O, H-1_b, H-6_b), 4,44-5,35 (varios s, 3,2H, OH y H-2 *ram*, H-5 *ram*), 7,26 (sa, 3,2H, IpMan-OCONH), 7,36 (sa, 0,8H, NH).

¹³C{¹H}-RMN (DMSO-*d*₆, 125 MHz), δ (ppm): 27,3 (CH₃), 37,1 (OCH₂CH₂S), 37,4 (HNCH₂CH₂S), 39,7 (HNCH₂CH₂S), 41,1 (HOCH₂CH₂S), 59,4 (HOCH₂CH₂S), 59,7 (C-1, C-6 terminal), 61,8 (OCH₂CH₂S), 63,0, 64,9 (C-1, C-6 *ram*), 65,8 (C-1, C-6), 70,1 (C-2, C-5), 72,8 (C-2, C-5 terminal), 74,4 (C-2, C-5 *ram*), 78,9 (C-3, C-4 *ram*), 79,2, 79,3 (C-3, C-4), 108,6, 108,9 [C(CH₃)₂], 155,9, 156,4 (CO).

CoPU {[IpMan]₅₂-DiT₄₈]DTDI}

IR: ν_{\max} (cm⁻¹) 3338 (OH, NH), 1681 (C=O), 1531 (N-H), 1261 (N-CO-O).

¹H RMN (DMSO-*d*₆, 500 MHz), δ (ppm): 1,31 (s, 6,2H, CH₃), 2,72-2,88 (m, 8H, SCH₂CH₂NH y SCH₂CH₂OH terminal), 2,92-3,06 (m, 3,8H, SCH₂CH₂O), 3,22-3,30 (m, 8H, CH₂NH), 3,46-3,77 (m, 2,1H, H-2, H-5, H-1_{a/b} *ram*, H-6_{a/b} *ram* y SCH₂CH₂OH terminal, H-1_{a/b}, H-6_{a/b}), 3,83-3,97 (m, 4,2H, H-1_a, H-3, H-4, H-6_a), 4,16-4,25 (m, 5,9H, SCH₂CH₂O, H-1_b, H-6_b), 4,36-5,20 (varios s, 2,1H, OH y H-2 *ram*, H-5 *ram*), 7,27 (sa, 2,1H, IpMan-OCONH), 7,38 (sa, 1,9H, NH).

¹³C{¹H}-RMN (DMSO-*d*₆, 125 MHz), δ (ppm): 27,2 (CH₃), 27,3 (CH₃ *ram*), 37,1 (OCH₂CH₂S), 37,4 (HNCH₂CH₂S), 39,7 (HNCH₂CH₂S), 41,2 (HOCH₂CH₂S), 59,4 (HOCH₂CH₂S, y C-1, C-6 terminal), 61,8, 61,9 (OCH₂CH₂S), 62,9, 63,8 (C-1, C-6 *ram*), 65,8 (C-1, C-6), 69,7 (C-2, C-5), 71,3, 72,7 (C-2, C-5 *ram*), 78,9 (C-3, C-4), 79,1, 79,2, 79,3 (C-3, C-4 *ram*), 108,6, 108,9 [C(CH₃)₂], 155,9, 156,3 (CO).

CoPU {[IpMan]₄₈-DiT₅₂]DTDI}

IR: ν_{\max} (cm⁻¹) 3339 (OH, NH), 1683 (C=O), 1531 (N-H), 1256 (N-CO-O).

¹H RMN (DMSO-*d*₆, 500 MHz), δ (ppm): 1,30 (s, 5,8H, CH₃), 2,72-2,88 (m, 8H, SCH₂CH₂NH y SCH₂CH₂OH terminal), 2,90-3,02 (m, 4,2H, SCH₂CH₂O), 3,20-3,32 (m, 8H, CH₂NH), 3,45-3,75 (m, 1,9H, H-2, H-5, H-1_{a/b} *ram*, H-6_{a/b} *ram* y SCH₂CH₂OH terminal, H-1_{a/b}, H-6_{a/b}), 3,80-3,97 (m, 3,8H, H-1_a, H-3, H-4, H-6_a), 4,10-4,27 (m, 6,1H, SCH₂CH₂O, H-1_b, H-6_b), 4,44-5,35 (varios s, 1,9H, OH y H-2 *ram*, H-5 *ram*), 7,26 (sa, 2H, IpMan-OCONH), 7,36 (sa, 2H, NH).

¹³C{¹H}-RMN (DMSO-*d*₆, 125 MHz), δ (ppm): 27,3 (CH₃), 37,1 (OCH₂CH₂S), 37,4 (HNCH₂CH₂S), 39,8 (HNCH₂CH₂S), 41,1 (HOCH₂CH₂S), 59,4 (HOCH₂CH₂S), 59,7 (C-1, C-6 terminal), 61,8, 61,9 (OCH₂CH₂S), 62,9 (C-1, C-6 *ram*), 65,8 (C-1, C-6), 70,1 (C-2, C-5), 77,8, 78,1 (C-3, C-4 *ram*), 79,2 (C-3, C-4), 108,9, 109,0 [C(CH₃)₂], 155,9, 156,3 (CO).

CoPU {[IpMan]₃₉-DiT₆₁]DTDI}

IR: ν_{\max} (cm⁻¹) 3324 (OH, NH), 1684 (C=O), 1532 (N-H), 1253 (N-CO-O).

¹H RMN (DMSO-*d*₆, 500 MHz), δ (ppm): 1,29 (s, 4,7H, CH₃), 2,71-2,84 (m, 8H, SCH₂CH₂NH y SCH₂CH₂OH terminal), 2,88-3,01 (m, 4,9H, SCH₂CH₂O), 3,20-3,29 (m, 8H, CH₂NH), 3,42-3,74 (m, 1,6H, H-2, H-5, H-1_{a/b} *ram*, H-6_{a/b} *ram* y SCH₂CH₂OH terminal, H-1_{a/b}, H-6_{a/b}), 3,81-3,95 (m, 3,1H, H-1_a, H-3, H-4, H-6_a), 4,16-4,26 (m, 6,4H, SCH₂CH₂O, H-1_b, H-6_b), 4,28-5,31 (varios s, 1,6H, OH y H-2 *ram*, H-5 *ram*), 7,27 (sa, 1,6H, IpMan-OCONH), 7,35 (sa, 2,4H, NH).

¹³C{¹H}-RMN (DMSO-*d*₆, 125 MHz), δ (ppm): 27,2 (CH₃), 27,3 (CH₃ *ram*), 37,1 (OCH₂CH₂S), 37,4 (HNCH₂CH₂S), 39,7 (HNCH₂CH₂S), 41,2 (HOCH₂CH₂S), 59,4 (HOCH₂CH₂S), 59,7 (C-1, C-6 terminal), 61,8, 61,9 (OCH₂CH₂S), 62,9, 63,8 (C-1, C-6 *ram*), 65,8 (C-1, C-6), 69,7 (C-2, C-5), 71,3, 72,4 (C-2, C-5 *ram*), 79,0 (C-3, C-4), 79,1, 79,2, 79,3 (C-3, C-4 *ram*), 108,6, 109,0 [C(CH₃)₂], 155,9, 156,3 (CO).

CoPU {[(IpMan)₂₀-DiT₈₀]DTDI}

IR: ν_{\max} (cm⁻¹) 3337 (OH, NH), 1681 (C=O), 1528 (N-H), 1263 (N-CO-O).

¹H RMN (DMSO-*d*₆, 500 MHz), δ (ppm): 1,31 (s, 2,4H, CH₃), 2,73-2,85 (m, 8H, SCH₂CH₂NH y SCH₂CH₂OH terminal), 2,90-3,01 (m, 6,4H, SCH₂CH₂O), 3,21-3,29 (m, 8H, CH₂NH), 3,44-3,74 (m, 0,8H, H-2, H-5, H-1_{a/b} *ram*, H-6_{a/b} *ram* y SCH₂CH₂OH terminal, H-1_{a/b}, H-6_{a/b}), 3,81-3,96 (m, 1,6H, H-1_a, H-3, H-4, H-6_a), 4,10-4,27 (m, 7,2H, SCH₂CH₂O, H-1_b, H-6_b), 4,45-5,27 (varios s, 0,8H, OH y H-2 *ram*, H-5 *ram*), 7,27 (sa, 0,8H, IpMan-OCONH), 7,35 (sa, 3,2H, NH).

¹³C{¹H}-RMN (DMSO-*d*₆, 125 MHz), δ (ppm): 27,2 (CH₃), 27,3 (CH₃ *ram*), 37,1 (OCH₂CH₂S), 37,4 (HNCH₂CH₂S), 39,7 (HNCH₂CH₂S), 41,2 (HOCH₂CH₂S), 59,4 (HOCH₂CH₂S), 61,8, 61,9 (OCH₂CH₂S), 63,0 (C-1, C-6 *ram*), 65,8 (C-1, C-6), 70,0, 70,1 (C-2, C-5), 72,8 (C-2, C-5 *ram*), 79,0 (C-3, C-4), 79,2, 79,3 (C-3, C-4 *ram*), 108,6, 108,9 [C(CH₃)₂], 155,9, 156,3 (CO).

CoPU {[(IpMan)₁₀-DiT₉₀]DTDI}

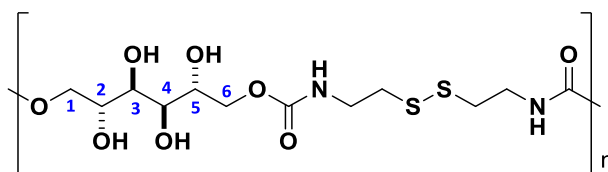
IR: ν_{\max} (cm⁻¹) 3337 (OH, NH), 1682 (C=O), 1530 (N-H), 1262 (N-CO-O).

¹H RMN (DMSO-*d*₆, 500 MHz), δ (ppm): 1,29, 1,30 (s, 1,2H, CH₃), 2,71-2,85 (m, 8H, SCH₂CH₂NH y SCH₂CH₂OH terminal), 2,90-3,01 (m, 7,2H, SCH₂CH₂O), 3,22-3,29 (m, 8H, CH₂NH), 3,37-3,73 (m, 0,4H, H-2, H-5, H-1_{a/b} *ram*, H-6_{a/b} *ram* y SCH₂CH₂OH terminal, H-1_{a/b}, H-6_{a/b}), 3,82-3,95 (m, 0,8H, H-1_a, H-3, H-4, H-6_a), 4,12-4,26 (m, 7,6H, SCH₂CH₂O, H-1_b, H-6_b), 4,40-5,29 (varios s, 0,4H, OH), 7,25 (sa, 0,4H, IpMan-OCONH), 7,34 (sa, 3,6H, NH).

¹³C{¹H}-RMN (DMSO-*d*₆, 125 MHz), δ (ppm): 27,2 (CH₃), 37,1 (OCH₂CH₂S), 37,4 (HNCH₂CH₂S), 39,7 (HNCH₂CH₂S), 41,2 (HOCH₂CH₂S), 59,4 (HOCH₂CH₂S), 61,8, 61,9 (OCH₂CH₂S), 62,9, 63,8 (C-1, C-6 *ram*), 65,8 (C-1, C-6), 69,7, 70,0 (C-2, C-5), 71,3 (C-2, C-5 *ram*), 79,0 (C-3, C-4 *ram*), 79,2 (C-3, C-4), 109,0 [C(CH₃)₂], 155,9, 157,7 (CO).

3.1.7B3 Hidrólisis de los grupos *O*-isopropilideno protectores de los homo- y copoliuretanos

HomoPU [(Man)DTDI]



El homoPU [(IpMan)DTDI] (0,7 g) en THF (5 LI) se trató con una mezcla de ácido trifluoroacético-agua 6:1 (6 mL) a 40-45 °C durante 24 h. La disolución se enfrió a temperatura ambiente y se añadió gota a gota sobre dietil éter frío, dando lugar a la precipitación del polímero, que se filtró, se lavó con dietil éter y se secó a vacío a 40 °C durante 24 h para dar el PU del título como un sólido blanco (0,5 g, Rto. 79%).

IR: ν_{\max} (cm⁻¹) 3322 (OH, NH), 1686 (C=O), 1531 (N-H), 1243 (N-CO-O).

¹H RMN (DMSO-*d*₆, 500 MHz), δ (ppm): 2,68-2,89 (m, 4H, SCH₂CH₂NH), 3,19-3,34 (m, 4H, CH₂NH), 3,33-3,50 (m, H-1_a ram, H-3 ram, H-4 ram, H-6_a ram y H-2, H-5 terminal), 3,52-3,72 (m, 4H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-1_{a'} ram, H-6_{a'} ram, H-1_{a/b}, H-6_{a/b} terminal), 3,81-3,99 (m, 4H, H-1_a, H-6_a), 4,01-4,43 (m, 2H, H-1_b, H-6_b y varios OH), 4,59-4,63 (H₂, H-5 ram), 7,22 (sa, 2H, NH).

¹³C{¹H}-RMN (DMSO-*d*₆, 125 MHz), δ (ppm): 37,4 (SCH₂), 39,7 (CH₂NH), 60,3 (C-1, C-6 terminal), 63,8 (C-1, C-6 ram), 67,1 (C-1, C-6), 68,8 (C-2, C-5), 69,1 (C-3, C-4), 64,9 (C-3, C-4 ram), 71,2 (C-2, C-5 terminal), 74,6 (C-2, C-5 ram), 156,7 (CO).

HomoPU [(Man-A)DTDI] y [(Man-B)DTDI] lineales

Una disolución de [(DlpMan-A)DTDI] o [(DlpMan-B)DTDI] lineales (0,35 g) en THF (2 mL) se agitó con una mezcla de ácido trifluoroacético-agua 6:1 (2,3 mL) a temperatura ambiente durante 3 h. Transcurrido este tiempo, la solución se añadió gota a gota sobre dietil éter frío, y el polímero precipitado se filtró, se lavó con dietil éter y se secó a vacío a 40 °C durante 24 h para dar el poliuretano del título como un sólido blanco (0,24 g, Rto. 82% y 0,25 g, Rto. 88%, respetivamente).

HomoPU [(Man-A)DTDI] lineal

IR: ν_{\max} (cm⁻¹) 3320 (N-H, O-H), 1687 (C=O), 1541 (N-H), 1261 (N-CO-O).

¹H RMN (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ (ppm) 2,69-2,91 (m, 4H, 2 CH₂S), 3,17-3,35 (m, 4H, CH₂NH), 3,43-3,74 (m, 4H, H-2, H-3, H-4, H-5), 3,69 (sa, 4H, 4 OH), 3,84-3,99 (m, 2H, H-1_a, H-6_a), 4,11-4,30 (m, 2H, H-1_b, H-6_b), 7,22 (sa, 2H, 2 NH).

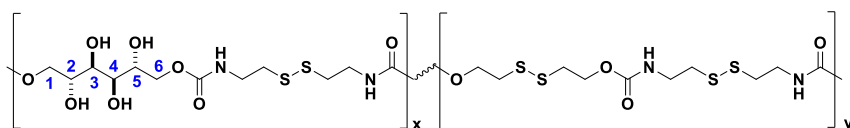
¹³C{¹H}-RMN (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ (ppm) 37,4 (CH₂S), 39,7 (CH₂NH), 67,1 (C-1, C-6), 68,8 (C-2, C-5), 69,1 (C-3, C-4), 156,8 (CO).

HomoPU [(Man-B)DTDI] lineal

IR: ν_{\max} (cm⁻¹) 3318 (N-H, O-H), 1686 (C=O), 1541 (N-H), 1261 (N-CO-O).

¹H RMN (DMSO-*d*₆, 500 MHz), δ (ppm): 2,71-2,83 (m, 4H, 2 CH₂S), 3,23-3,31 (m, 4H, 2 CH₂NH), 3,50-3,58 (m, 2H, H-3, H-4), 3,59-3,83 (m, 6H, H-2, H-5, 4 OH), 3,88-3,96 (m, 2H, H-1_a, H-6_a), 4,20-4,27 (m, 2H, H-1_b, H-6_b), 7,21 (sa, 2H, 2 NH).

¹³C{¹H}-RMN (DMSO-*d*₆, 125 MHz), δ (ppm): 37,4 (CH₂S), 39,7 (CH₂NH), 67,1 (C-1, C-6), 68,8 (C-2, C-5), 69,1 (C-3, C-4), 156,7 (CO).

CoPU {[(Man)_x-DiT_y]DTDI}**CoPU {[(Man)₈₁-DiT₁₉]DTDI}**

Este coPU se obtuvo por tratamiento de {[lpMan]₈₁-DiT₁₉]DTDI} (0,7 g) en THF (5 mL) con una mezcla de ácido trifluoroacético-agua 6:1 (6 mL) a 40-45 °C durante 24 h. El proceso de aislamiento fue el mismo que para el homopolímero [(Man)DTDI] descrito anteriormente, dando lugar a un sólido blanco (0,5 g, Rto. 81%).

IR: ν_{\max} (cm⁻¹) 3320 (OH, NH), 1684 (C=O), 1532 (N-H), 1254 (N-CO-O).

¹H RMN (DMSO-*d*₆, 500 MHz), δ (ppm): 2,69-2,84 (m, 8H, SCH₂CH₂NH), 2,87-3,00 (m, 1,5H, SCH₂CH₂O), 3,18-3,32 (m, 8H, CH₂NH), 3,32-3,52 (m, 7,8 H, OH, H-1_{a/b} *ram*, H-3, H-4, H-6_{a/b}, H-1_{a/b} terminal, H-6_{a/b} terminal), 3,54-3,74 (m, 6,5H, H-2, H-3, H-4, H-5), 3,82-3,95 (m, 3,2H, H-1_a, H-6_a), 4,14-4,26 (m, 4,8H, SCH₂CH₂O, H-1_b, H-6_b), 4,28-4,89 (varios s, 5,3H, OH, H-2, H-5 *ram*), 7,22 (sa, 3,2H, Man-OCONH), 7,36 (sa, 0,8H, NH).

¹³C{¹H}-RMN (DMSO-*d*₆, 125 MHz), δ (ppm): 37,4 (OCH₂CH₂S), 37,8 (HNCH₂CH₂S), 39,7 (HNCH₂CH₂S), 60,4 (C-1, C-6 terminal), 61,8 (OCH₂CH₂S), 63,9 (C-1, C-6 *ram*), 67,1 (C-1, C-6), 68,7 (C-2, C-5), 69,0 (C-3, C-4), 69,3 (C-3, C-4 *ram*), 71,2 (C-2, C-5 terminal), 74,9 (C-2, C-5 *ram*), 155,9, 156,7 (CO).

CoPU {[(Man)₄₈-DiT₅₂] DTDI}

Una disolución de {[(IpMan)₄₈-DiT₅₂] DTDI} (0,63 g) en THF (10 mL) se agitó con una mezcla de ácido trifluoroacético-agua 6:1 (12 mL) a 40-45 °C durante 24 h. El polímero del título se aisló, como se describió anteriormente, como un sólido blanco (0,5 g, Rto. 69%).

IR: ν_{\max} (cm⁻¹) 3324 (OH, NH), 1682 (C=O uretano), 1531 (N-H), 1254 (N-CO-O).

¹H RMN (DMSO-*d*₆, 500 MHz), δ (ppm): 2,70-2,86 (m, 8H, SCH₂CH₂NH y SCH₂CH₂OH terminal), 2,90-3,02 (m, 4,2H, SCH₂CH₂O), 3,20-3,34 (m, 8H, CH₂NH), 3,53-3,73 (m, 3,8H, H-2, H-3, H-4, H-5 y SCH₂CH₂OH terminal), 3,82-3,97 (m, 1,9H, H-1_a, H-6_a), 4,10-4,32 (m, 6,1H, SCH₂CH₂O, H-1_b, H-6_b), 4,44-4,94 (varios s, 1,9H, OH), 7,25 (sa, 1,9H, Man-OCONH), 7,39 (sa, 2,1H, NH).

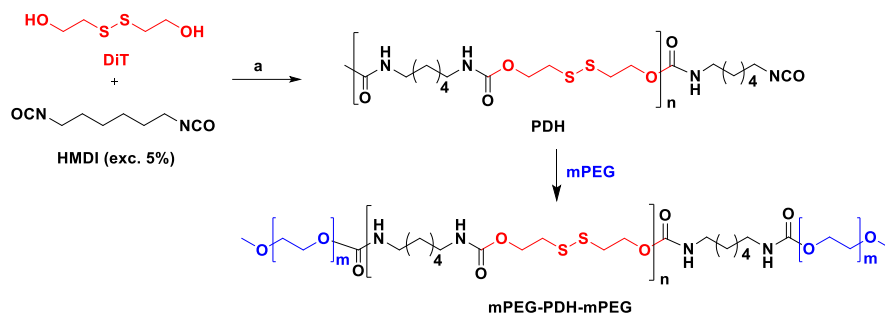
¹³C{¹H}-RMN (DMSO-*d*₆, 125 MHz), δ (ppm): 37,1 (OCH₂CH₂S), 37,4 (HNCH₂CH₂S), 39,8 (HNCH₂CH₂S), 41,1 (HOCH₂CH₂S terminal), 59,4 (HOCH₂CH₂S terminal), 61,8 (OCH₂CH₂S), 67,1 (C-1, C-6), 68,7 (C-2, C-5), 69,0 (C-3, C-4), 155,9, 156,6 (CO).

3.2 Copoliuretanos tribloque

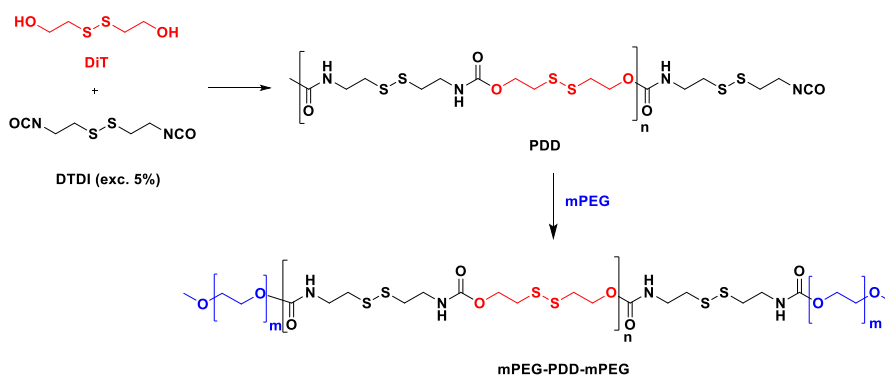
En la presente tesis se han sintetizado copoliuretanos tribloque de naturaleza anfífila con el objeto de estudiar el autoensamblaje de los mismos en forma de polimersomas. También se han llevado a cabo ensayos preliminares sobre su capacidad para actuar como sistemas matriciales para liberación de fármacos. Estos coPU están constituidos por un dominio o bloque central derivado de los poliuretanos descritos en el apartado anterior y dominios hidrófilos externos basados en polietilén glicol monometil éter (mPEG).

3.2.1 Síntesis y caracterización estructural

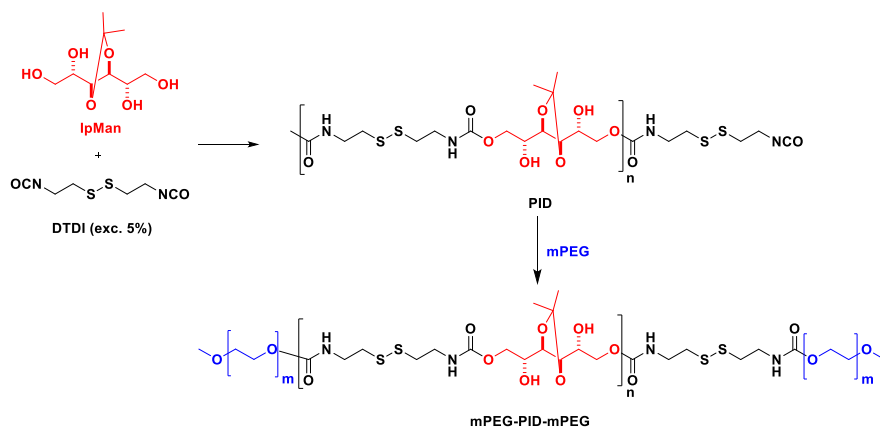
Los coPU tribloque aquí descritos se sintetizaron a partir de los dioles DiT o IpMan y exceso del 5% de los diisocianatos HMDI o DTDI (Esquemas 3.8-3.10). Así se obtuvieron los bloques centrales tipo telequérico y se determinó el peso molecular de los mismos mediante la extracción de alícuotas y análisis por GPC. Posteriormente, se procedió a la m-PEGilación por tratamiento con mPEG (peso molecular 2000 g mol^{-1}) en las cantidades molares calculadas. Todas las reacciones de poliadición se llevaron a cabo en atmósfera inerte utilizando *N,N*-dimetilacetamida (DMA) seca como disolvente y dilaurato de dibutilestano (II) como catalizador, a temperatura ambiente. Debido a que las condiciones de reacción son idénticas para todos los coPU, éstas solo se han indicado en el Esquema 3.8.



Esquema 3.8. Reacciones de poliadición conducentes a mPEG-PDH-mPEG. En DMA, dilaurato de dibutilestano (II) (catalizador), t.a.



Esquema 3.9. Reacciones de poliadición conducentes a mPEG-PDD-mPEG.



Esquema 3.10. Reacciones de poliadición conducentes a mPEG-PID-mPEG.

Los coPU aquí descritos fueron caracterizados por GPC, FTIR-ATR, RMN y análisis térmico. Los pesos moleculares M_w oscilaron en el rango 25600-29500 g mol⁻¹, y los valores de polidispersidad estuvieron comprendidos entre 1,0 y 1,1. Los datos referentes a los rendimientos y pesos moleculares de los coPU m-PEGilados se detallan en la Tabla 3.7.

Todos los coPU presentaron en los espectros de IR bandas de absorción características del grupo carbamato. Su estructura química se determinó por ¹H RMN, para ello resultó de utilidad comparar los espectros de estos coPU con los espectros correspondientes a los homoPU [(DiT)DTDI] e [(IpMan)DTDI] descritos en el apartado 3.1.2. La Figura A12 del Apéndice de espectros muestra el ¹H RMN de mPEG-PDH-mPEG.

Tabla 3.7. Rendimiento y pesos moleculares de los coPU tri-bloque mPEGilados.

Copolyuretano	Rto. (%)	GPC		
		M_w^a	M_n^a	M_w/M_n^a
mPEG-PDH-mPEG	89	25.600	25.100	1,0
mPEG-PDD-mPEG	89	29.200	27.100	1,1
mPEG-PID-mPEG	57	29.500	27.400	1,1

^a Pesos moleculares promedio en peso y número expresados en g mol⁻¹ y polidispersidades estimadas por análisis mediante GPC en DMF/LiBr como fase móvil frente a patrones de poliestireno.

3.2.2 Propiedades térmicas

Las propiedades térmicas de los copolímeros mPEGilados se estudiaron mediante DSC y TGA y la Tabla 3.8 recoge los resultados obtenidos. En primer lugar, el estudio de TGA mostró que eran estables hasta alcanzar temperaturas comprendidas entre 260-270 °C. Las descomposiciones tuvieron

lugar en dos etapas, con temperaturas de descomposición máxima entre 262 y 398 °C, lo que indica que estos materiales tienen una alta estabilidad térmica (Figura 3.21).

Los estudios de DSC de los coPU PEGilados mostraron un comportamiento similar a los coPU anteriormente estudiados (Sección 3.1.2), si bien los primeros mostraron valores inferiores de T_g .

Tabla 3.8. Propiedades térmicas de coPU m-PEGilados.

Copolíureto	TGA			DSC		
	T_d^a (°C)	T_{ds}^b (°C)	ΔW^c (%)	T_g^d (°C)	T_m^e (°C)	ΔH_m^e (J g ⁻¹)
mPEG-PDH-mPEG	259	264/340	8	1	145	51
mPEG-PDD-mPEG	271	271/360	19	-7	100	83
mPEG-PID-mPEG	262	262/398	2	49		

^a Temperatura de descomposición correspondiente al 10% de pérdida de peso registrada en las curvas de TGA a 10 °C min⁻¹.

^b Temperatura de descomposición máxima.

^c Peso remanente tras la descomposición a 600 °C.

^d Temperatura de transición vítrea tomada como el punto de inflexión de las curvas de calentamiento de DSC de las muestras fundidas registradas a 20 °C min⁻¹.

^e Temperatura de fusión (T_m) y sus respectivas entalpías (ΔH_m) medidas por DSC en el primer calentamiento a 10 °C min⁻¹.

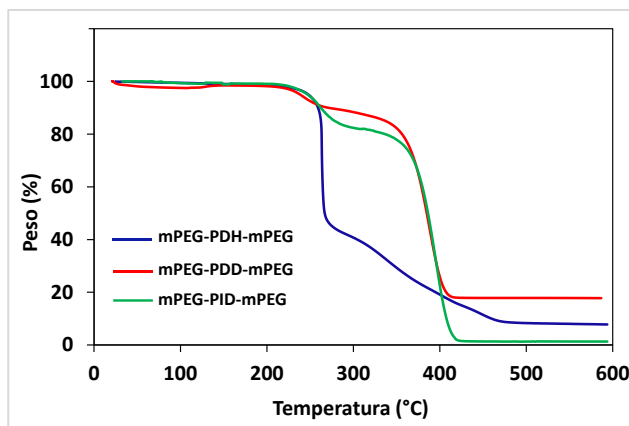


Figura 3.21. Curvas comparativas obtenidas por TGA (pérdida de peso frente a temperatura) de las degradaciones térmicas bajo atmósfera inerte de los coPU mPEGilados.

3.2.3 Estudios de formación de polymersomas

Para evaluar la capacidad de formación de vesículas se siguió el procedimiento anteriormente descrito (Shi *et al.*, 2009). Para ello, a una disolución del coPU mPEGilado seleccionado en THF, en atmósfera de argón y con agitación vigorosa, se le adicionó agua mediante una bomba de perfusión durante 200 h. Después se evaporó lentamente el THF y la fase acuosa se estudió mediante difusión de luz dinámica (DLS) para determinar el tamaño de las vesículas formadas. También se llevó a cabo el estudio de esta fase por microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y la variante de la microscopía electrónica de transmisión de barrido (STEM). Los resultados obtenidos por DLS y por microscopía fueron convergentes, es decir, se observaron similitudes entre los datos obtenidos por ambas técnicas en todos los casos.

Para mPEG-PDH-mPEG se observó tanto por DLS como por microscopía la presencia de agregados con diámetros cercanos a 200 nm (Figura 3.22). Para el resto de coPU que contenían unidades estructurales procedentes de DTDI, se observaron por microscopia partículas esféricas más pequeñas (Figura 3.23), con diámetros comprendidos entre 22,9 y 131,8 nm, siendo mPEG-PID-mPEG, el que presentó el diámetro más elevado. Estos datos fueron confirmados por DLS (Figura 3.23).

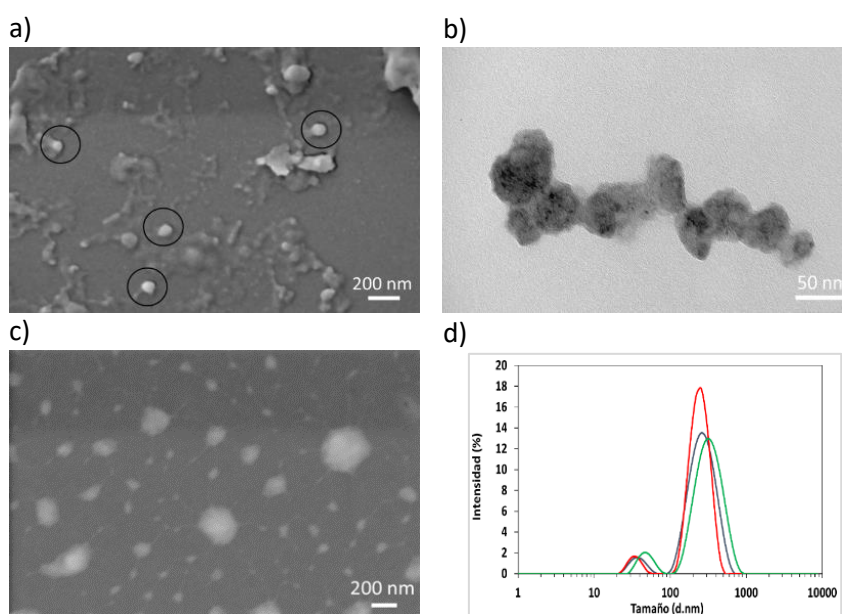


Figura 3.22. Micrografías (a) SEM; (b) TEM; (c) STEM; (d) análisis del tamaño de partícula medido por DLS de los polymersomas obtenidos a partir de mPEG-PDH-mPEG.

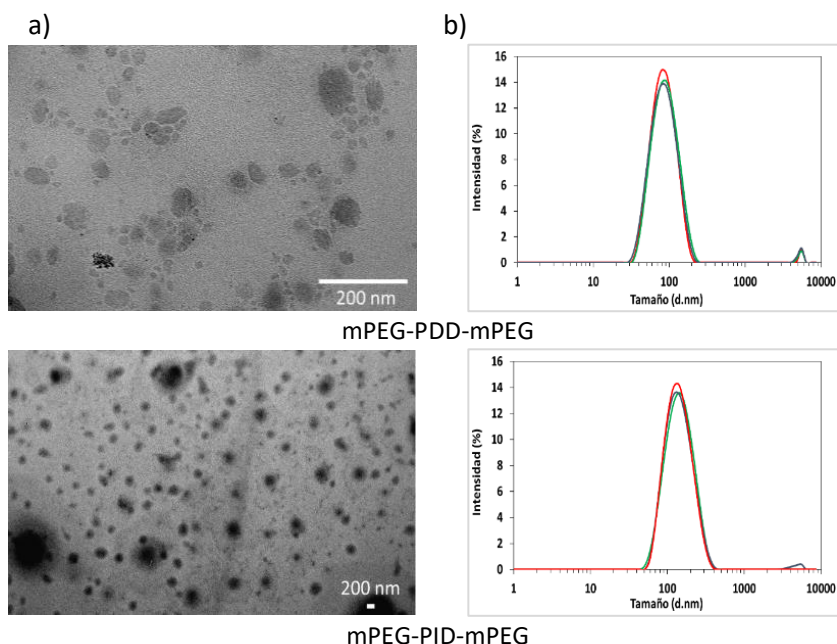


Figura 3.23. Micrografías (a) SEM; (b) Análisis del tamaño de partícula medido por DLS de los polymersomas obtenidos a partir de los coPU indicados en cada caso.

3.2.4 Estudios de liberación de fármacos

Los estudios de encapsulación de fármacos en los polymersomas anteriormente descritos, para su aplicación como sistemas de liberación dirigida y controlada de fármacos anticancerosos como doxorrubicina, se están llevando a cabo en la actualidad en colaboración con el grupo del profesor Isidoro Caraballo, del Departamento de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de Sevilla.

Anteriormente, el mismo grupo llevó a cabo estudios de liberación de fármacos empleando como excipiente mPEG-PDH-mPEG. El objetivo de este estudio consistió en la evaluación de la capacidad de este coPU como

excipiente formador de matrices y la posible sinergia de la técnica USAC (compresión asistida por ultrasonidos) para controlar y liberar el fármaco modelo teofilina en el tracto gastrointestinal. Para ello se prepararon comprimidos matriciales de teofilina/mPEG-PDH-mPEG, 80/20 p/p por compresión directa (DC) y mediante compresión asistida por ultrasonidos (USAC). La Figura 3.24 muestra los ensayos de liberación de teofilina de los sistemas obtenidos mediante DC y USAC, en agua desionizada a $37 \pm 0,5$ °C. Los comprimidos DC liberaron el fármaco en 4 h. En cambio, los comprimidos obtenidos mediante USAC fueron menos porosos y controlaron la liberación más eficazmente, consiguiendo la total liberación de teofilina en más de 8 h.

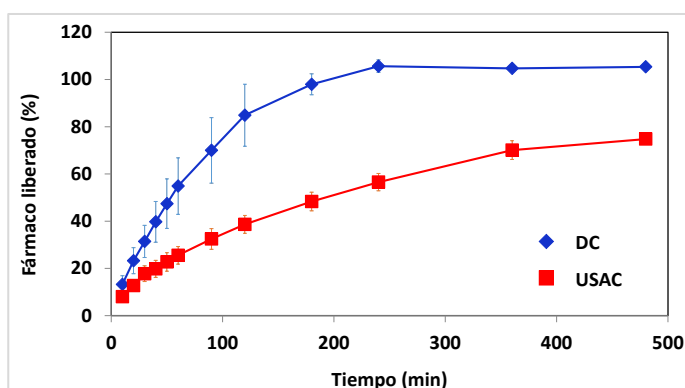


Figura 3.24. Perfiles de liberación de teofilina en agua a partir de teofilina/mPEG-PDH-mPEG, 80/20 p/p. Método DC (azul) y USAC (rojo).

La Figura 3.25 presenta los resultados de los ensayos de liberación de teofilina del sistema obtenido mediante USAC, en agua (línea roja) y mediante cambio secuencial de pH añadiéndose glutatión para simular el medio reductor característico del colon (línea azul). Se pueden observar similitudes en los perfiles durante la primera fase (2 h a pH 1,2). Durante la segunda fase, 2 h a pH 6,8 se produjo un aumento considerable (aprox. 35%) de liberación

de teofilina. En el tramo íleon/colon (pH 7,5) se observó un incremento brusco de liberación de aprox. 15% durante media hora. Este comportamiento ya había sido observado con sistemas matriciales obtenidos a partir de otros poliuretanos descritos en esta Tesis (Sección 3.1.2). Este efecto se atribuye a la biodegradabilidad que presentan estos materiales que contienen enlaces disulfuro susceptibles de ser degradados en el entorno reductor del colon.

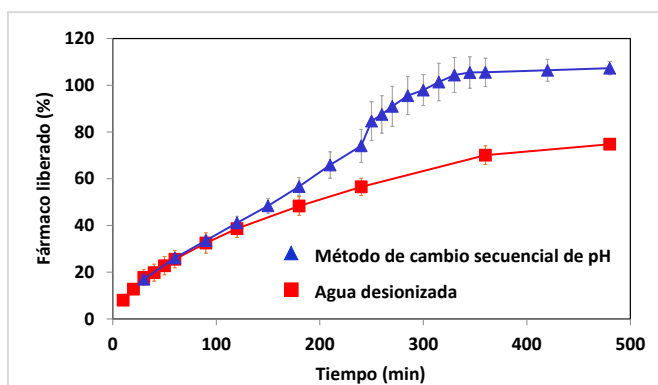


Figura 3.25. Perfiles de liberación de teofilina en agua a partir de teofilina/mPEG-PDH-mPEG, 80/20 p/p. En agua (rojo) y cambio secuencial de pH (azul).

3.2.5 Parte experimental

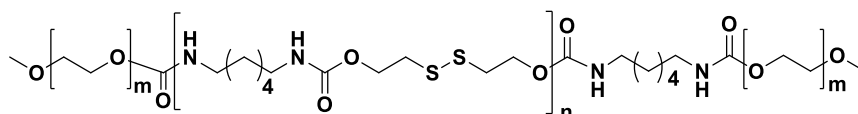
3.2.5A Procedimiento general para la síntesis coPU mPEGilados

Todos los coPU mPEGilados se obtuvieron como se describe a continuación. El correspondiente diol DiT o IpMan (1 mmol) se pesó en un matraz de fondo redondo y el sistema se trató con tres ciclos de vacío-argón antes de la adición de *N,N*-dimetilacetamida (DMA) seca (1 mL). La mezcla se agitó hasta obtener una disolución homogénea y, posteriormente, se añadió el diisocianato correspondiente (HMDI o DTDI) (1,05 mmol, 5% exceso), seguido de una gota del catalizador [dilaurato de dibutilestano (II)]. La

agitación se mantuvo a temperatura ambiente durante 3 h. Transcurrido este tiempo, se adicionó la cantidad molar calculada de mPEG disuelta en 1 mL de DMA. La agitación se continuó a temperatura ambiente durante las siguientes 24 h. Finalmente, la mezcla de reacción se precipitó gota a gota sobre dietil éter frío (300 mL). El polímero precipitado se filtró, se lavó con éter dietílico, y se secó a vacío a 40 °C durante 24 h para obtener los coPU como materiales sólidos blancos con buenos rendimientos.

3.2.5B Caracterización espectroscópica de los coPU mPEGilados

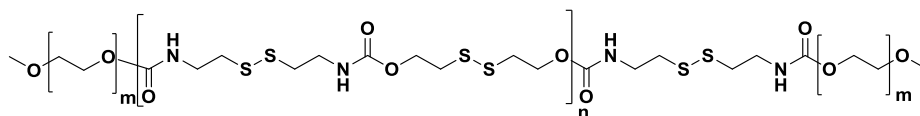
mPEG-PDH-mPEG



IR: ν_{\max} (cm^{-1}) 2881 (O-C), 1684 (C=O), 1535 (N-H), 1239 (N-CO-O), 1105 (C-O-C).

^1H RMN (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ (ppm) 1,15-1,44 [various m, n·8H, $(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NH}$], 2,86-3,01 (m, n·8H, CH_2NH , SCH_2), 3,23-3,25 (s, 6H, CH_3), 3,48-3,53 (m, m·4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4,10-4,24 (m, n·4H, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 7,13 (m, n·2H, NH).

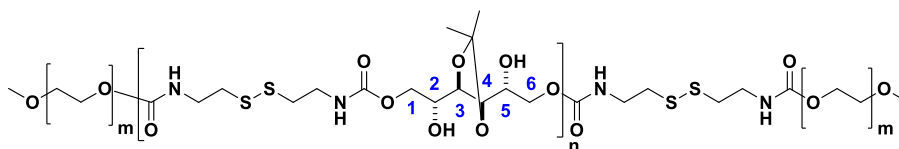
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ (ppm) 25,9, 26,1 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 29,3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 37,1 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 39,7 (CH_2NH), 58,0 (OCH_3), 60,2, 61,5 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 69,8 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 71,3, 72,3 (CH_2OCH_3), 155,9 (CO).

mPEG-PDD-mPEG

IR: ν_{\max} (cm^{-1}) 2881 (O-C), 1702 (C=O), 1540 (N-H), 1241 (N-CO-O), 1101 (C-O-C).

^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz): δ (ppm) 2,72-2,83 (m, $n\cdot 4\text{H}$, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 2,91-3,00 (m, $n\cdot 4\text{H}$, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3,21-3,28 (m, $n\cdot 4\text{H}$, CH_2NH), 3,34-3,38 (m, 6H, CH_3O), 3,39-3,59 (m, $m\cdot 4\text{H}$, CH_2O), 4,15-4,23 (m, $n\cdot 4\text{H}$, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 7,35 (s, $n\cdot 2\text{H}$, NH).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz): δ (ppm) 37,0 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 37,4 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 39,7 (CH_2NH), 58,0 (OCH_3), 61,8 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 69,8 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 71,3, 72,3 (CH_2OCH_3), 155,9 (CO).

mPEG-PID-mPEG

IR: ν_{\max} (cm^{-1}) 2880 (O-C), 1700 (C=O), 1540 (N-H), 1241 (N-CO-O), 1101 (C-O-C).

^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz): δ (ppm) 1,13 [s, $n\cdot 6\text{H}$, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 2,74-2,85 (m, $n\cdot 4\text{H}$, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3,21-3,28 (m, $n\cdot 4\text{H}$, CH_2NH), 3,36-3,40 (m, 6H, CH_3O), 3,41-3,63 (m, $m\cdot 4\text{H} + n\cdot 8\text{H}$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$, H-1_{a/b}, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6_{a/b}), 4,51-4,59 (m, $n\cdot 2\text{H}$, OH), 7,30, 7,38 (s, $n\cdot 2\text{H}$, NH).

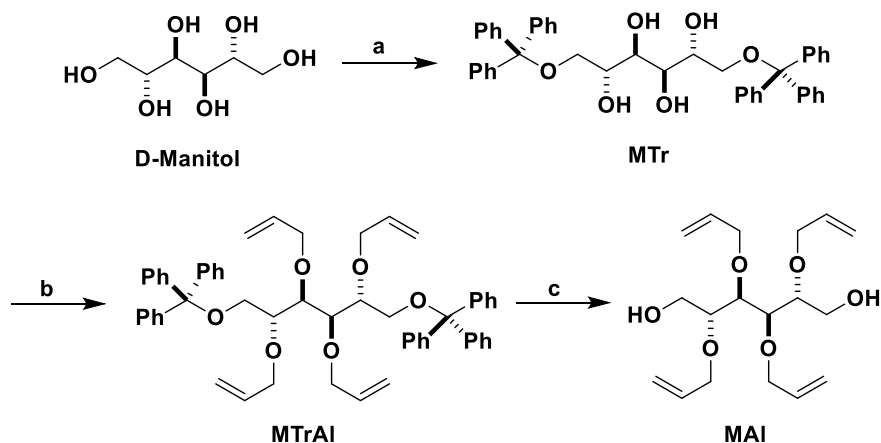
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ (ppm) 26,8 (CH_3), 37,4 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 39,8 (CH_2NH), 58,0 (OCH_3), 60,2 (C-1, C-6), 69,8 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 71,3 (CH_2OCH_3), 72,3 (C-2, C-5), 79,4 (C-3, C-4), 155,6 (CO).

3.3 Poliuretanos catiónicos

Se han obtenido poliuretanos catiónicos a partir de tri- y tetra-*O*-alil derivados de L-arabinitol y D-manitol, respectivamente. Se ha estudiado el comportamiento de estos PU para formar complejos con ADN, así como su capacidad para transferir este material en diferentes líneas celulares.

3.3.1 Síntesis de monómeros

En primer lugar, se preparó 2,3,4-di-*O*-alil-L-arabinitol (AAI) según la metodología descrita anteriormente en nuestro de investigación (Ferris *et al.*, 2011). En cambio 2,3,4,5-tetra-*O*-alil-D-manitol (MAI) se ha sintetizado por primera vez y tanto el monómero MAI como los compuestos intermedios MTr y MTrAl se obtuvieron con buenos rendimientos químicos (Esquema 3.11).



Esquema 3.11. Síntesis de 2,3,4,5-tetra-*O*-alil-D-manitol (MAI). (a) Ph_3CCl , py, t.a.; (b) 1. NaH, THF, 30 °C. 2. Bromuro de alilo, 30 °C; (c) $p\text{Ts-SO}_3\text{H}$, CH_2Cl_2 -MeOH 1:1, t.a.

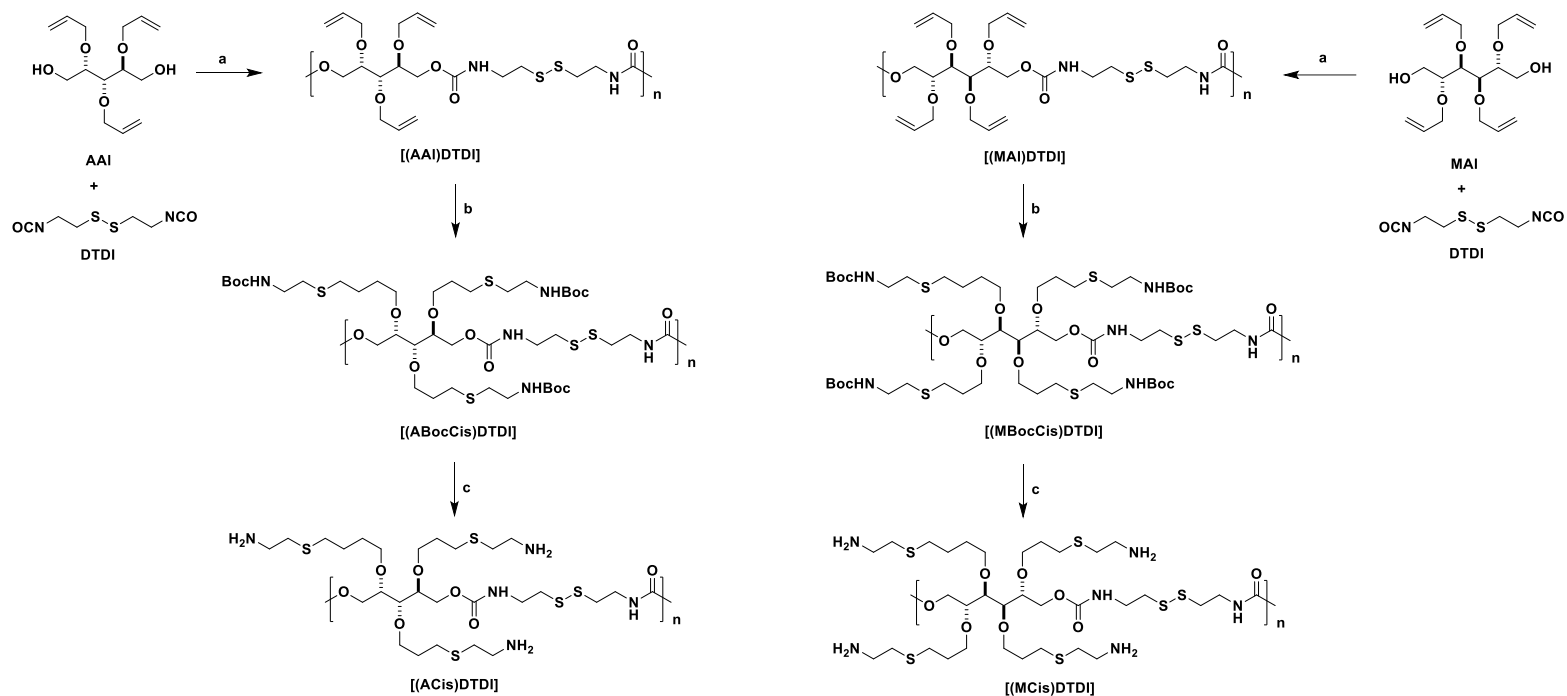
3.3.2 Síntesis y caracterización estructural

A partir de los monómeros descritos anteriormente, se prepararon los nuevos PU [(AAI)DTDI] y [(MAI)DTDI] (Esquema 3.12). Las polimerizaciones se llevaron a cabo empleando THF seco como disolvente y dilaurato de dibutilestaño (II) como catalizador, a 40°C bajo atmósfera inerte, durante 24 h. Estos PU multialilados se aislaron con rendimientos superiores al 85%. A continuación, se llevaron a cabo las reacciones “click” tiol-eno con cisteamina *N*-Boc protegida (BocCis), dando lugar a [(ABocCis)DTDI] y [(MBocCis)DTDI]. Estas adiciones se llevaron a cabo en DMF seca, AIBN como iniciador atmósfera inerte, a 80°C, durante 24 h. Los polímeros [(ABocCis)DTDI] y [(MBocCis)DTDI] también se obtuvieron con elevados rendimientos. La adición de BocCis a los polímeros alilados fue confirmada mediante ^1H RMN por la desaparición de las señales vinílicas de los grupos alilo a δ 5,04-5,33 ppm y 5,79-5,99 ppm y la aparición de las señales correspondientes al grupo protector de *N*-Boc, localizadas a δ 1,40 ppm para los grupos CH_3 y a δ 6,85-6,96 ppm para los NH. Los rendimientos y pesos moleculares de estos PU se recogen en Tabla 3.10.

La *N*-desprotección de [(ABocCis)DTDI] y [(MBocCis)DTDI] se llevó a cabo por tratamiento con cloruro de hidrógeno 4N en dioxano anhidro, dando lugar a los hidroclouros de los PU policatiónicos [(ACis)DTDI] y [(MCis)DTDI], respectivamente. La eliminación de los grupos protectores *N*-Boc se constató por ^{13}C RMN, desapareciendo las señales a δ 28,3 ppm, δ 76,8 ó 77,7 ppm y δ 155,3 ppm, atribuidas a dicho grupo. En cambio, en los espectros de ^1H RMN los grupos amonio se observaron a δ 8,34 ppm. En el Apéndice de espectros se proporciona el espectro bidimensional de correlación heteronuclear HETCOR de [(MCis)DTDI] (Figura A13). Mediante espectroscopia de infrarrojos también se pudo observar la presencia de los grupos amonio de [(ACis)DTDI]

y [(MCis)DTDl] por el aumento en la intensidad de la banda de vibración de tensión de N-H a 2898 cm^{-1} (Figura 3.26).

La determinación de los pesos moleculares de los PU catiónicos [(ACis)DTDl] y [(MCis)DTDl] no se pudo realizar mediante GPC. En los cromatogramas obtenidos empleando agua-sulfato de sodio 0,1 M o DMF-LiBr como fase móvil, no se detectaron curvas de distribución de pesos moleculares. Esto podría deberse a interacciones permanentes de los PU catiónicos con la fase estacionaria de las columnas. Por ello, para la determinación del peso molecular se recurrió al análisis mediante ^1H RMN y los resultados se recogen en la Tabla 3.10. De esta manera, se identificaron los grupos hidroxilo terminales de las cadenas de [(ACis)DTDl] y [(MCis)DTDl], mediante tratamiento con D_2O , y se estudiaron sus integrales con relación al resto de señales correspondientes a la UCR. Según estos cálculos, para [(ACis)DTDl] y [(MCis)DTDl] se encontraron M_n de 4.950 y 3.500 g mol^{-1} , respectivamente.



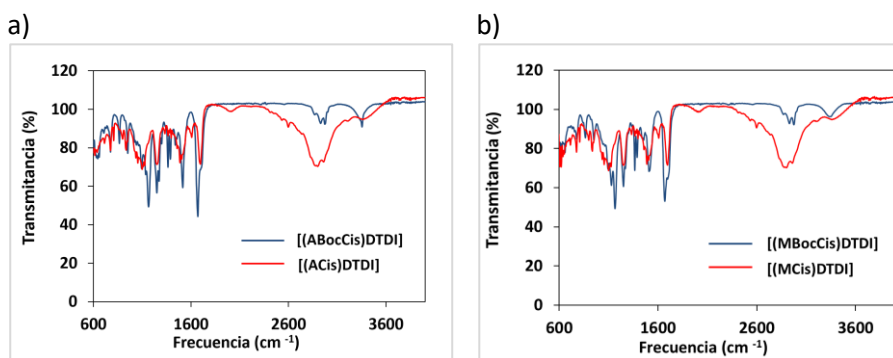
Esquema 3.12. Reacciones de poliadición conducentes a PU alílicos, basados en D-manitol, y posterior derivatización mediante reacciones “click” tiol-eno. (a) THF, dilaurato de dibutilestaño (II), 40 °C; (b) (2-mercaptoetil)carbamato de *terc*-butilo, AIBN, 80 °C; (c) 4N HCl, 1,4-dioxano, t.a.

Tabla 3.10. Rendimiento y pesos moleculares promedio de los PU catiónicos y sus precursores.

Poliuretano	Rto. (%)	GPC		
		M_w^a	M_n^a	M_w/M_n^a
[(AAI)DTDI]	85	39.500	32.100	1,2
[(ABocCis)DTDI]	96	30.400	29.000	1,0
[(ACis)DTDI]	50	-	4.950 ^b	-
[(MAI)DTDI]	88	27.100	26.070	1,0
[(MBocCis)DTDI]	96	37.890	34.380	1,0
[(MCis)DTDI]	66	-	3.500 ^b	-

^a Pesos moleculares promedio en peso y número expresados en g mol^{-1} y polidispersidades estimadas por GPC con DMF/LiBr como fase móvil usando patrones de poliestireno.

^b Estimados mediante $^1\text{H RMN}$.

**Figura 3.26.** Espectros IR de (a) [(ACis)DTDI] y su precursor [(ABocCis)DTDI]; (b) [(MCis)DTDI] y su precursor [(MBocCis)DTDI].

3.3.3 Propiedades térmicas

Los resultados de los análisis térmicos mediante TGA y DSC de los PU descritos en esta sección se presentan en la Tabla 3.11. El análisis térmico mediante TGA de los derivados *O*-alilados presentaron estabilidad térmica hasta 222 °C y 188 °C, según derivasen de L-arabinitol o D-manitol,

respectivamente. El resto de PU incluidos los catiónicos fueron estables hasta alcanzar los 240 °C. En todos los casos, la descomposición tuvo lugar en dos etapas. La primera de ellas transcurrió a temperaturas comprendidas entre 256 y 259 °C, y la segunda etapa entre 324 y 333 °C. La Figura 3.27 muestra los perfiles de descomposición obtenidos para los PU catiónicos [(ACis)DTDI] y [(MCis)DTDI].

Los estudios de DSC mostraron que los PU aquí descritos presentaron valores de T_g entre 2 °C y 18 °C, correspondiendo los valores más bajos a los PU catiónicos. Sólo se observaron transiciones térmicas asociadas a fusión para los *N*-Boc derivados [(ABocCis)DTDI] y [(MBocCis)DTDI] en torno a 75 y 115 °C. El resto de los PU, tanto los alilados como los catiónicos, fueron materiales amorfos.

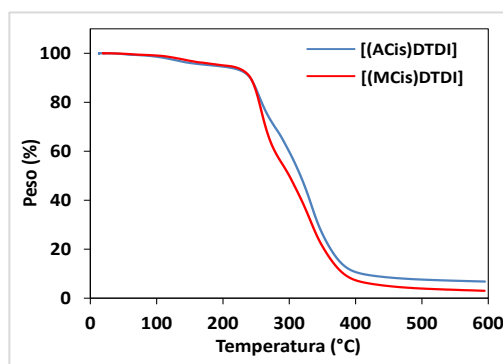


Figura 3.27. Curvas comparativas obtenidas por TGA (pérdida de peso frente a temperatura) de las degradaciones térmicas bajo atmósfera inerte de los PU [(ACis)DTDI] y [(MCis)DTDI].

3.3.4 Estudio de interacciones poliuretano-ADN

La evaluación de la capacidad de los PU catiónicos para formar complejos con ADN, se ha llevado a cabo en el Departamento de Química Física de la Facultad de Química de la Universidad de Sevilla, bajo la dirección de las profesoras M^a Luisa Moyá Morán y Pilar López Cornejo.

Se ha estudiado la interacción de [(ACis)DTDI] y [(MCis)DTDI] con el ADN de doble hebra de timo de ternera. Para ello, se realizaron una serie de medidas experimentales: a) Estudio del tamaño de los poliplexos formados con el ADN y potencial zeta, para estimar la carga del ADN; b) Ensayos de fluorescencia, para estudiar la competitividad entre el bromuro de etidio y los PU catiónicos en presencia de ADN.

Tabla 3.11. Propiedades térmicas de los PU catiónicos y sus precursores.

Poliuretano	TGA			DSC		
	T_d^a (°C)	T_{ds}^b (°C)	ΔW^c (%)	T_g^d (°C)	T_m^e (°C)	ΔH_m^e (J g ⁻¹)
[(AAI)DTDI]	222	256/324	42/41	18		
[(ABocCis)DTDI]	240	257/331	38/50	10	77/114	59/86
[(ACis)DTDI]	241	255/333	25/62	4		
[(MAI)DTDI]	188	257/328	34/51	14		
[(MBocCis)DTDI]	242	259/327	51/41	8	72/117	31/33
[(MCis)DTDI]	242	258/332	40/52	2		

^a Temperatura de descomposición correspondiente al 10% de pérdida de peso registrada en las curvas de TGA a 10 °C min⁻¹.

^b Temperatura de descomposición máxima.

^c Peso remanente tras la descomposición a 600 °C.

^d Temperatura de transición vítrea tomada como el punto de inflexión de las curvas de calentamiento de DSC de las muestras fundidas registradas a 20 °C min⁻¹.

^e Temperatura de fusión (T_m) y sus respectivas entalpías (ΔH_m) medidas por DSC en el primer calentamiento a 10 °C min⁻¹.

Se ha demostrado que [(ACis)DTDI] y [(MCis)DTDI] se asocian al ADN. La Figura 3.28 muestra la dependencia del potencial ξ con la relación molar [PU]/[ADN] para los distintos PU estudiados. Las medidas se llevaron a cabo a una concentración fija de ADN de 3×10^{-5} M y las disoluciones se prepararon con buffer HEPES 40 mM a pH 7,4. Se observa que un aumento de la relación molar [PU]/[ADN] produce un aumento de ξ .

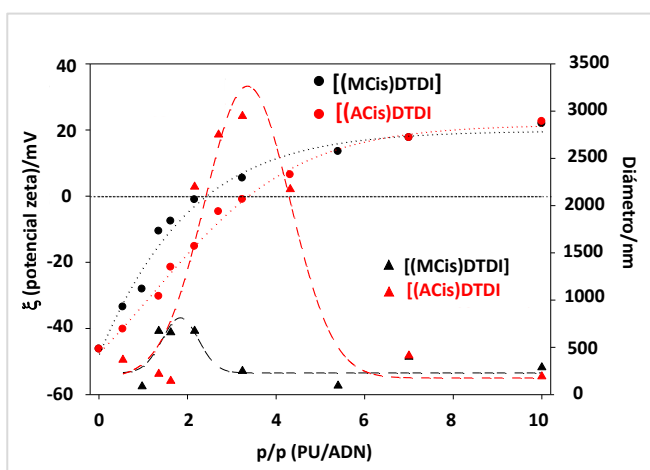
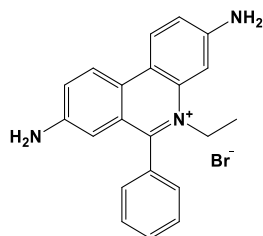


Figura 3.28. Valores del potencial zeta, ξ , a diferentes concentraciones p/p [PU]/[ADN] a 25 °C. [ADN]= 3.0×10^{-5} M, buffer HEPES 40 mM a pH=7,4. La línea punteada corresponde al ajuste de los datos experimentales a una sigmoidal.

El bromuro de etidio (EB) (Esquema 3.13) contiene una parte aromática plana que se intercala con facilidad entre los pares de bases nitrogenadas de la doble hélice del ADN, asociándose al polinucleótido de manera no específica. De acuerdo con hallazgos previos, la intensidad de emisión de fluorescencia del EB aumenta en disolución acuosa en presencia de ADN debido a su interacción con el polinucleótido (Rodríguez-Pulido *et al.*, 2009).



Esquema 3.13. Estructura del bromuro de etidio (EB).

Los resultados de los estudios de fluorescencia se muestran en la Figura 3.29 donde se representa la dependencia de I/I_0 BE frente a la relación molar $[PU]/[ADN]$ a 25 °C, a 588nm. I_0 e I son las intensidades de emisión de fluorescencia del EB en ausencia y en presencia de los polímeros ensayados, respectivamente. Las medidas fueron realizadas manteniendo constante las concentraciones de ADN y de bromuro de etidio, 3×10^{-5} M y 4.9×10^{-6} M, respectivamente, a pH 7,4 (buffer HEPES 40 mM).

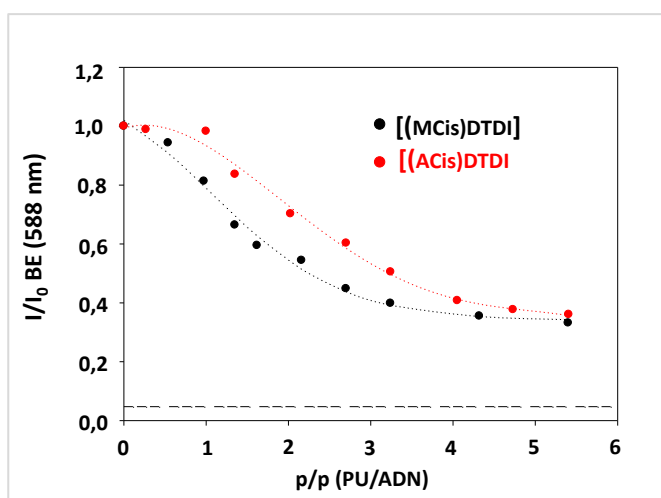


Figura 3.29. Dependencia de I/I_0 de EB a diferentes concentraciones p/p $[PU]/[ADN]$. $[ADN] = 3 \times 10^{-5}$ M y $[EB] = 4.9 \times 10^{-6}$ M, buffer HEPES 40 mM a pH 7.4.

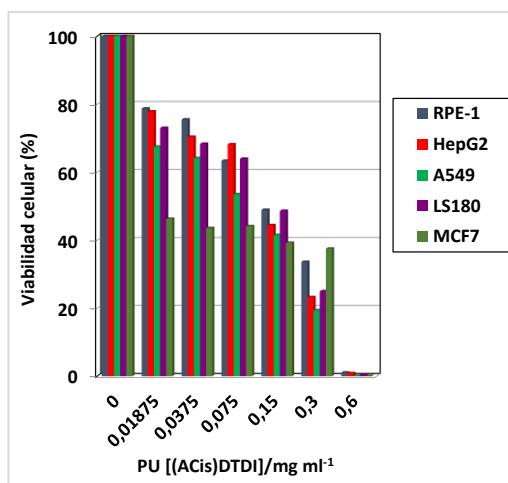
La dependencia de I/I_0 sigue una tendencia sigmoideal decreciente para los dos polímeros estudiados. La disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia de EB en función del aumento de la concentración de polímero indica que los PU interaccionan con ADN, desplazando EB hacia la disolución acuosa.

3.3.5 Estudios de viabilidad celular

Para determinar la viabilidad celular de los PU catiónicos [(ACis)DTDI] y [(MCis)DTDI] se han llevado a cabo estudios de citotoxicidad en diferentes líneas celulares cancerosas. Este estudio se ha llevado a cabo por la Dra. Clara B. García Calderón en el Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS). Las líneas celulares cancerosas ensayadas fueron las siguientes: A549 (células del epitelio alveolar basal de carcinoma pulmonar), H358 (cáncer de pulmón humano), HepG2 (carcinoma hepaticocelular), LS180 (adenocarcinoma colorrectal) y MCF7 (adenocarcinoma de mama). También se estudió como referencia la línea celular sana RPE-1 (células epiteliales del pigmento de la retina). Se tomaron medidas en periodos de tiempo establecidos a 96 h y los resultados obtenidos se presentan en la Figura 3.28. En ella se puede observar un perfil de citotoxicidad similar para ambos PU en todas las líneas celulares ensayadas, disminuyendo la viabilidad celular a medida que aumenta la concentración de polímero.

En general, el mejor perfil de viabilidad celular lo presentó [(MCis)DTDI]. Ninguno de ellos presentó efectos tóxicos en las diferentes líneas celulares a concentraciones moderadas, siendo la viabilidad de más del 50% a concentraciones de $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$. Este PU presentó el mejor perfil de toxicidad en la línea de células sanas (RPE-1), manteniendo la viabilidad celular en torno al 70% a la concentración de $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$.

a)



b)

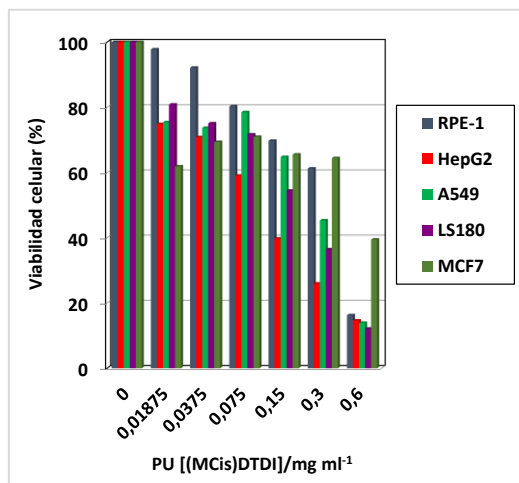
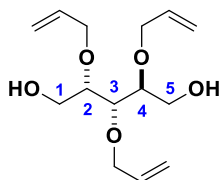


Figura 3.28. Estudio de viabilidad celular de los PU (a) [(ACis)DTDI]; (b) [(MCis)DTDI] para diferentes líneas celulares después de 96 h.

3.3.6 Parte experimental

3.3.6A Monómeros

2,3,4-tri-*O*-alil- L-arabinitol (AAI)

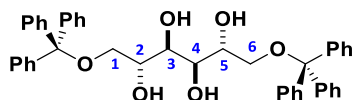


El monómero AAI se obtuvo según la metodología descrita (Ferris *et al.*, 2011). IR: ν_{\max} (cm⁻¹) 3649 (O-H), 2925 (C-H vinilo), 1735 (C=C), 1217, 1277 (C-O-C), 1032 (C-OH).

¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ 2,29-2,50 (m, 2H, OH), 3,56-3,65 (m, 2H, H-2/H-4), 3,66-3,89 (m, 5H, H-1_{a/b}, H-3, H-6_{a/b}), 4,00-4,29 (m, 6H, 3CH₂CH=CH₂), 5,12-5,34 (m, 6H, 3CH=CH₂), 5,82-6,01 (m, 3H, 3CH=CH₂).

¹³C RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ 60,8 (C-5), 61,7 (C-1), 71,2, 72,0, 73,7 (3CH₂-CH=), 79,1, 79,2, 79,3 (C-2, C-3, C-4), 117,5, 117,6, 117,8 (3CH=CH₂), 134,6, 134,8, 134,9 (3CH=CH₂).

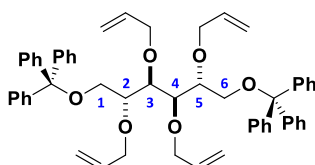
1,6-Di-*O*-tritol-D-Manitol (TrM)



A una disolución de D-manitol (7 g, 38,5 mmol) en piridina (210 mL) en un matraz de fondo redondo, se le añadió cloruro de trifenilmetilo (21,15 g, 76,9 mmol) y la mezcla se agitó a 25 °C durante 15 días al abrigo de la luz. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se concentró a un tercio de su volumen original. El residuo obtenido se precipitó sobre agua y hielo (1,5 L)

y posteriormente se filtró para dar el compuesto del título como un sólido blanco (24,6 g, 99%, p.f. 89-92 °C) [Lit. p.f. 90-93 °C (Mancera *et al.*, 2003)].

2,3,4,5-Tetra-*O*-alil-1,6-di-*O*-tritol-D-Manitol (TrMAI)



A una suspensión de hidruro de sodio (60% p/p, 0,86 g, 21,6 mmol) en THF seco (5 mL), previamente lavado con pentano (3 x 21 mL), se adicionó, gota a gota, a 0 °C bajo atmósfera de argón, una disolución de 1,6-di-*O*-tritol-D-manitol (TrM) (3,28 g, 4,92 mmol) en THF seco (21 mL). La mezcla se agitó a 30 °C durante 1 hora, después se adicionó bromuro de alilo (1,87 mL, 21,65 mmol) y se mantuvo la agitación durante 24 h a la misma temperatura. Al cabo de este tiempo, se adicionó metanol (2,6 mL) gota a gota y se dejó agitar durante 1 hora más. La mezcla de reacción se evaporó a presión reducida para obtener un residuo que fue disuelto en una mezcla CH₂Cl₂-H₂O 1:1 (100 mL). La fase orgánica se lavó con agua (30 mL), se secó sobre MgSO₄ y se concentró a sequedad para dar un residuo que se purificó por cromatografía en columna usando la mezcla TBME-hexano 1:9. El compuesto TrMAI se obtuvo como un sólido blanco de punto de fusión 71-73 °C (Rto. 3,1 g, 77%).

IR: ν_{\max} (cm⁻¹) 2962 (C-H vinilo), 1736 (C=C vinilo), 1541, 1489, 1457 (C=C arom), 1259 (C-O-C).

¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz): δ (ppm) 3,08-3,14 (dd, 2H, H-1_a, H-6_a, J = 4,01 y 10,4 Hz), 3,54-3,59 (dd, 2H, H-1_b, H-6_b, J = 1,9 y 10,3 Hz), 3,60-3,65 (m, 2H, H-2, H-5), 3,84-3,94 (m, 6H, 3 CH₂-CH=CH₂), 4,08-4,14 (d, 2H, H-3, H-4, J = 8,0 Hz), 4,24-4,31 (dd, 2H, CH₂-CH=CH₂, J = 12,6 y 5,3 Hz), 4,85-4,96 (m, 4H, 2 CH=CH₂), 5,20-

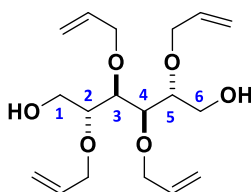
5,46 (m, 4H, 2 CH=CH₂), 5,50-5,61 (m, 2H, 2 CH=CH₂), 5,97-6,08 (m, 2H, 2 CH=CH₂), 7,25-7,37 (m, 30H, Ph).

¹³C RMN (CDCl₃, 125 MHz): δ (ppm) 62,3 (C-1, C-6), 71,0, 73,4 (4 CH₂-CH=CH₂), 77,8 (C-3, C-4), 78,6 (C-2, C-5), 86,6 (2 CPh₃), 116,1 (CH=CH₂), 127,1, 127,9, 129,1 (Ph), 135,2, 135,5 (CH=CH₂), 144,4 (C cuat. de Ph).

HRFABMS: Masa molecular (Da) calculada para C₅₆H₅₈O₆ (M + Na)⁺: 849,4098; Masa molecular (Da) experimental: 849,4126.

Análisis elemental calculado para C₅₆H₅₈O₆: C, 81,32; H, 7,07. Encontrado: C, 81,61; H, 7,11.

2,3,4,5-Tetra-*O*-alil-D-Manitol (MAI)



A una disolución de TrMAI (3,43 g, 4,1 mmol) en CH₂Cl₂-MeOH 1:1 (100 mL), se le añadió gota a gota una disolución de ácido *p*-toluenosulfónico (2,14 g, 12,4 mmol) en CH₂Cl₂-MeOH 1:1 (70 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Posteriormente se añadió NaHCO₃ (3,75 g, 44,6 mmol) y se continuó la agitación durante 1 hora a la misma temperatura. Transcurrido ese tiempo, se concentró a pequeño volumen, dando lugar a una suspensión que se filtró a través de celita. Los filtrados reunidos se concentraron a sequedad y el residuo resultante se purificó mediante columna cromatográfica utilizando EtOAc-hexano 1:2 como eluyente para dar MAI como un aceite incoloro.

Rto. 1,1 g, 79%. IR: ν_{max} (cm⁻¹) 3649 (O-H), 2962 (C-H vinilo), 1735 (C=C vinilo), 1259 (C-O-C), 1016 (C-OH).

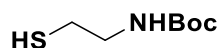
^1H RMN (CDCl_3 , 500 MHz): δ (ppm) 2,21-2,30 (m, 2H, OH), 3,52-3,61 (m, 2H, H-2, H-5), 3,68-3,78 (m, 4H, H-1_a, H-3, H-4, H-6_a), 3,84-3,93 (m, 2H, H-1_b, H-6_b), 3,94-4,27 (m, 8H, 4 $\text{CH}_2\text{-CH=CH}_2$), 5,08-5,34 (m, 8H, CH=CH_2), 5,84-5,96 (m, 4H, CH=CH_2).

^{13}C RMN (CDCl_3 , 125 MHz): δ (ppm) 60,3 (C-1, C-6), 70,5, 73,9 (4 $\text{CH}_2\text{CH=CH}_2$), 78,5 (C-3, C-4), 79,5 (C-2, C-5), 117,1 (4 CH=CH_2), 134,7 134,9 (4 CH=CH_2).

HRFABMS: Masa molecular (Da) calculada para $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_6$ ($\text{M} + \text{Na}$)⁺: 365,1898; Masa molecular (Da) experimental: 365,1930.

Análisis elemental calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_7$: C, 59,98; H, 8,95. Encontrado: C, 62,00; H, 8,78.

(2-Mercaptoetil)carbamato de *terc*-butilo (BocCis)



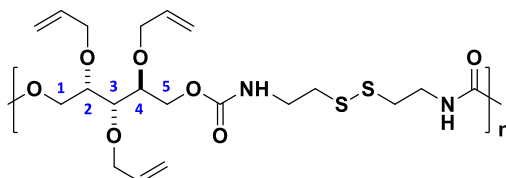
Este compuesto se obtuvo según se describió anteriormente (Ferris *et al.*, 2012). Rto. 2,2 g, 52 %. IR: ν_{max} (cm^{-1}) 3353 (N-H), 1690 (C=O), 1508 (N-H), 1243 (C-N).

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 1,34 (t, 1H, SH, $J = 8,58$ Hz), 1,45 (s, 9H, 3 CH_3), 2,58-2,70 (m, 2H, CH_2SH), 3,22-3,38 (m, 2H, CH_2NH), 4,91 (bs, 1H, NH).

^{13}C RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 25,3 (CH_2S) 28,6 (CH_3), 43,8 (CH_2N), 79,8 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 155,9 (CO).

3.3.6B Poliuretanos

[(AAI)DTDI]

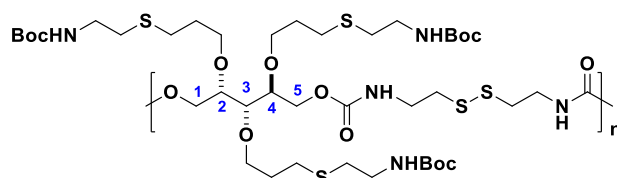


En un matraz de fondo redondo se pesó AAI (1,09 g, 4 mmol) y el sistema se trató con tres ciclos de argón/vacío antes de la adición de THF seco (2,5 mL). La mezcla se agitó hasta obtener una disolución y, a continuación, se añadió DTDI (0,82 g, 4 mmol) bajo atmósfera de argón, seguido de una gota del catalizador [dilaurato de dibutilestaño (II)] y se dejó agitando a 40 °C durante 24 h. Finalmente, la mezcla de reacción se trató con alcohol *terc*-butílico (1,2 ml) durante 30 minutos y se precipitó gota a gota sobre éter dietílico frío (200 ml). El precipitado se filtró, se lavó con dietil éter, y el material obtenido se secó a vacío a 40 °C durante 24 h, identificándose como el PU del título (Rto. 1,6 g, 85%).

IR: ν_{\max} (cm⁻¹) 3329 (N-H), 1697 (C=O), 1522 (N-H), 1249 (N-CO-O).

¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz): δ (ppm) 2,72-2,85 (m, 4H, CH₂S), 3,22-3,34 (m, 4H, CH₂NH), 3,51-3,60 (m, 1H, H-3), 3,61-3,78 (m, 2H, H-2, H-4), 3,89-4,21 (m, 8H, H-1_a, H-5_a, OCH₂-CH=CH₂), 4,30-4,38 (m, 2H, H-1_b, H-5_b), 5,07-5,30 (m, 6H, CH=CH₂), 5,79-5,99 (m, 3H, CH=CH₂), 7,37 (s, 2H, NH).

¹³C RMN (CDCl₃, 125 MHz): δ (ppm) 37,7 (CH₂S), 39,9 (CH₂NH), 62,8, 63,5 (C-1, C-5), 70,3, 71,5, 72,8 (OCH₂-CH=CH₂), 76,7, 77,8 (C-2, C-3, C-4), 116,3, 116,6 (CH=CH₂), 135,4 (CH=CH₂), 155,8 (CO).

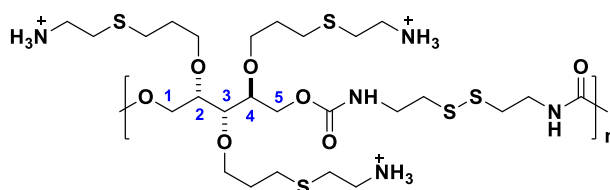
[(ABocCis)DTDI]

El PU [(AAI)DTDI] (0,17 g, 0,37 mmol) se disolvió en DMF (1,2 mL) y la disolución resultante se desoxigenó mediante corriente de argón durante 30 minutos. A continuación, se añadió BocCis (0,78 g, 5,1 mmol) y 2,2'-azobisisobutironitrilo (AIBN) como iniciador (0,15 g, 0,88 mmol) bajo atmósfera de argón. La disolución se agitó a 80 °C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, la disolución se vertió gota a gota sobre dietil éter frío (300 mL) y polímero precipitado se filtró y, posteriormente, se purificó mediante disolución en DCM y reprecipitación en dietil éter. El precipitado se filtró, se lavó con dietil éter, y el material obtenido se secó a vacío a 40 °C durante 24 h, identificándose como [(ABocCis)DTDI] (Rto. 1,0 g, 96%).

IR: ν_{\max} (cm⁻¹) 3354 (N-H), 1671 (C=O), 1516 (N-H), 1250 (N-CO-O).

¹H RMN (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ (ppm) 1,40 [sa, 27H, C(CH₃)₃], 1,68-1,78 (m, 6H, OCH₂CH₂CH₂S), 2,41-2,60 (m, 12H, OCH₂CH₂CH₂SCH₂, SCH₂CH₂NHBoc), 2,70-2,77 (m, 4H, CH₂S-S), 3,02-3,10 (m, 6H, CH₂NHBoc), 3,14-3,26 (m, 4H, S-SCH₂CH₂NH), 3,35-3,74 (m, 9H, H-2, H-3, H-4, OCH₂CH₂CH₂S), 3,83-4,44 (m, 4H, H-1, H-5), 6,87, 6,96, (sa, 3H, NHBoc), 7,98 (sa, 2H, NH).

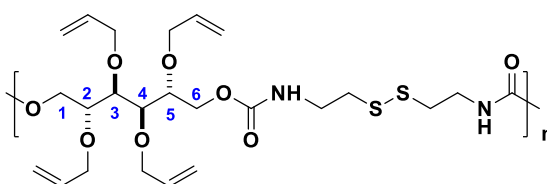
¹³C RMN (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ (ppm) 28,3 (CH₃), 30,9 (OCH₂CH₂CH₂S), 35,5 (CH₂S, SCH₂), 37,6 (CH₂S-S), 39,0 (CH₂NH), 43,4 (CH₂NHBoc), 62,9, 64,5 (C-1, C-5), 70,1 (OCH₂), 74,0, 74,5, 78,1 (C-2, C-3, C-4), 77,9 [C(CH₃)₃], 155,6 (CO), 162,4 (CO Boc).

[(ACis)DTDI]

A un matraz cargado con [(ABocCis)DTDI] (230 mg, 0,23 mmol) se le añadió una disolución de cloruro de hidrógeno 4N en dioxano seco (17,2 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 4 h, bajo atmósfera de argón. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se filtró y el producto obtenido se secó a vacío a 40 °C durante 24 h y se identificó como [(ACis)DTDI] (Rto. 79 mg, 50%). IR: ν_{\max} (cm⁻¹) 3359 (N-H), 2899 (amonio), 1696 (C=O), 1500 (N-H), 1250 (N-CO-O).

¹H RMN (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ (ppm) 1,68-1,80 (m, 6H, OCH₂CH₂CH₂S), 2,54-2,79 (m, 12H, CH₂S), 2,90-3,21 (m, 14H, CH₂S-S, CH₂NH₂, CH₂NH), 3,34-3,72 (m, 9H, OCH₂CH₂CH₂S, H-2, H-3, H-4), 3,89-4,40 (varios m, 4H, H-1_{a/b}, H-5_{a/b}), 7,46 (sa, 2H, NH), 8,34 (sa, 6H, NH₃⁺).

¹³C RMN (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ (ppm) 27,4, 27,7 (OCH₂CH₂CH₂S), 29,6 (SCH₂CH₂NH₃⁺), 33,9 (OCH₂CH₂CH₂S), 37,8 (CH₂NH₃⁺), 38,1, 38,5 (CH₂S-S), 41,9 (CH₂NH), 63,1 (C-1/C-5), 66,3 (OCH₂CH₂CH₂S), 77,3 (C-2/C-3/C-4), 156,0 (C=O cadena).

[(MAI)DTDI]

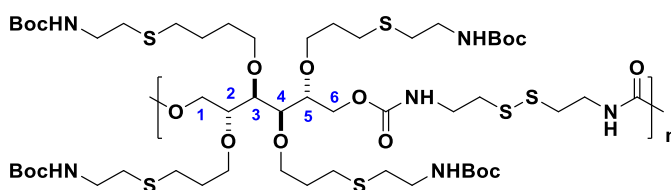
En un matraz de fondo redondo se pesó el compuesto MAI (1,11 g, 3,25 mmol) y el sistema se trató con tres ciclos de argón/vacío antes de la adición de THF seco (2,2 mL). La mezcla se agitó para obtener una disolución y transcurrido este tiempo, se añadió DTDI (0,66 g, 3,25 mmol), seguido de una gota del catalizador [dilaurato de dibutilestaño (II)] y se continuó la agitación a 40 °C durante 24 h en atmósfera inerte. Finalmente, la mezcla de reacción se trató con alcohol *terc*-butílico (0,97 mL) y se mantuvo la agitación durante 30 minutos adicionales. Transcurrido este tiempo, se precipitó gota a gota sobre éter dietílico frío (200 mL). El precipitado se filtró, se lavó con éter dietílico frío y se secó a vacío a 40°C durante 24 h (Rto. 1,6 g, 88%).

IR: ν_{\max} (cm⁻¹) 3337 (NH), 1698 (C=O), 1523 (N-H), 1251 (N-CO-O).

¹H-RMN (CDCl₃, 500 MHz): δ (ppm) 2,72-2,85 (m, 4H, CH₂S), 3,22-3,35 (m, 4H, CH₂NH), 3,39-4,60 (varios m, 16H, H-1_{a/b}, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6_{a/b}, OCH₂-CH=CH₂), 5,04-5,33 (m, 8H, CH=CH₂), 5,81-5,99 (m, 4H, CH=CH₂), 7,37 (s, 2H, NH).

¹³C-RMN (CDCl₃, 125 MHz): δ (ppm) 37,7 (CH₂S), 39,8 (CH₂NH), 58,7, 62,2 (C-1, C-6), 69,8, 73,0 (OCH₂-CH=CH₂), 76,9, 77,5, 77,8, 79,1 (C-2, C-3, C-4, C-5), 115,9, 116,1 (CH=CH₂), 135,3, 135,7 (CH=CH₂), 156,3 (CO).

[(MBocCis)DTDl]



El [(MAI)DTDl] (200 mg, 0,37 mmol) se disolvió en DMF (1,2 mL) y la disolución resultante se desoxigenó mediante corriente de argón durante 30 minutos. A continuación, se le añadió BocCis (1,04 g, 7,85 mmol) y 2,2'-

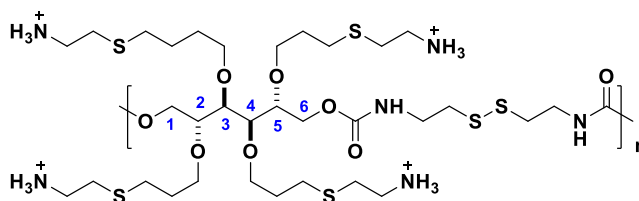
azobisisobutironitrilo (AIBN) (0,20 g, 1,18 mmol) bajo atmósfera de argón. La disolución se agitó a 80 °C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, la disolución se vertió gota a gota sobre dietil éter frío (300 mL) y el polímero precipitado se filtró y se purificó mediante disolución en DCM y reprecipitación en dietil éter, obteniéndose [(MBocCis)DTDI] que se secó a vacío a 40°C durante 24 h (Rto. 160 mg, 96%).

IR: ν_{\max} (cm⁻¹) 3339 (NH), 1669 (C=O), 1509 (N-H), 1269 (N-CO-O).

¹H RMN (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ (ppm) 1,40 [sa, 36H, C(CH₃)₃], 1,69-1,81 (m, 8H, OCH₂CH₂CH₂S), 2,43-2,60 (m, 16H, SCH₂CH₂NHBoc, OCH₂CH₂CH₂S), 2,71-2,79 (m, 4H, CH₂S-S), 3,03-3,15 (m, 8H, SCH₂CH₂NHBoc), 3,17-3,25 (m, 4H, S-S-CH₂CH₂NH), 3,37-3,84 (m, 12H, H-2/H-3/H-4/H-5, OCH₂CH₂CH₂S), 3,85-4,57 (m, 4H, H-1/H-6), 6,85, 6,94, (sa, 3H, NHBoc), 7,98 (sa, 2H, NH).

¹³C RMN (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ (ppm) 28,2 (CH₃), 30,7 (OCH₂CH₂CH₂S), 35,7 (CH₂S, SCH₂), 37,8 (CH₂S-S), 38,7 (CH₂NH), 41,1 (CH₂NHBoc), 64,7 (C-1/C-6), 70,1 (OCH₂), 76,0, 76,7 (C-2/C-3/C-4/C-5), 77,7 [C(CH₃)₃], 154,6 (C=O Boc), 162,2 (C=O cadena).

[(MCis)DTDI]



El PU [(MBocCis)DTDI] (0,24 g, 0,19 mmol) se trató con una disolución de cloruro de hidrógeno 4N en dioxano seco (18,6 mL) y la suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 4 h, en atmósfera inerte. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se filtró y el producto

obtenido se secó a vacío a 40 °C durante 24 h y se identificó como [(MCis)DTDI] (Rto. 106 mg, 66 %).

IR: ν_{\max} (cm⁻¹) 3359 (N-H), 2898 (amónio), 1696 (C=O), 1500 (N-H), 1251 (N-CO-O).

¹H RMN (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ (ppm) 1,68-1,80 (m, 8H, OCH₂CH₂CH₂S), 2,54-2,79 (m, 16H, CH₂S), 2,90-3,21 (m, 16H, CH₂S-S, CH₂NH₂, CH₂NH), 3,34-3,72 (m, 12H, OCH₂CH₂CH₂S, H-2, H-3, H-4, H-5), 3,88-4,03 (m, 2H, H-1_a, H-6_a), 4,35-4,79 (m, 2H, H-1_b, H-6_b), 7,46 (sa, 2H, NH), 8,34 (sa, 8H, NH₃⁺).

¹³C RMN (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ (ppm) 27,4, 27,7 (OCH₂CH₂CH₂S), 29,6 (SCH₂CH₂NH₃⁺), 33,8 (OCH₂CH₂CH₂S), 37,8 (CH₂NH₃⁺), 38,0, 38,3 (CH₂S-S), 41,7 (CH₂NH), 63,4 (C-1, C-6), 66,3 (OCH₂CH₂CH₂S), 77,1 (C-2, C-3, C-4, C-5), 154,8 (CO).

CAPÍTULO

4

Functionalized polytriazoles

This chapter describes the synthesis and characterization of functionalized polytriazoles, most of them containing D-mannitol moieties and/or disulfide groups. The ability of polycationic triazoles to form complexes with DNA and further transfection into cells have been explored.

4.1 Synthesis of monomers

First, the synthesis of bifunctional monomers for obtaining polytriazoles (hereinafter PT) is described. Three different alkynyl monomers were prepared and their structures are shown in Schemes 4.1-4.3 as well as in the Experimental Section of this chapter.

The dialkyne derivative bis-(2-aminoethyl)-2-(*tert*-butoxycarbonylamine)ethylpropiolamide (TA) was synthesized from commercial tris-(2-aminoethyl)amine through its *N-tert*-butoxycarbonyl derivative (Benito *et al.*, 2004), which was treated, without prior purification, with propiolic acid and *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) as a condensing agent. The new monomer TA was obtained in moderate yield as an orange solid of low melting point.

Monomer 2,2'-dithiodiethanol dipropiolate (DPL) was synthesised by refluxing a solution of propiolic acid, 2,2'-dithiodiethanol and *p*-toluenesulfonic acid in toluene, using a Dean-Stark apparatus for 24 hours, in 43% yield. During the development of the present thesis, Baier *et al.* published the preparation of this monomer and its use for click polymerization to prepare glutathione responsive hyaluronic acid nanocapsules (Baier *et al.*, 2016).

Besides monomer dipropargyl 3,3'-dithiodipropionate (DPN) was synthesised from 2,2'-dithiopropionic acid and propargyl alcohol in dry THF, in the presence of DCC and 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP) as described (Han *et al.*, 2012) in 69% yield. Other condensing agent as 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC) has been recently used (Chen *et al.*, 2016).

On the other hand, three diazide D-mannitol monomers were prepared with partial or fully *O*-protected secondary hydroxyl groups as isopropylidene or acetyl groups: 1,6-diazo-1,6-dideoxy-3,4-*O*-isopropylidene-D-mannitol (IM) (Le Merrer *et al.*, 1987) and 2,3,4,5-tetra-*O*-acetyl-1,6-diazo-1,6-dideoxy-D-mannitol (AM) (Fidalgo *et al.*, 2013). The new monomer 2,5-di-*O*-acetyl-1,6-diazo-1,6-dideoxy-3,4-*O*-isopropylidene-D-mannitol (AIM) was obtained as a colourless liquid in 74% yield. Finally the diazido monomer 1,1'-diazo-1,1'-dideoxy-2,2'-dithiodiethanol (DT) was obtained from commercial dithiodiethanol as previously described (Wang *et al.*, 2011).

All monomers were characterized by ^1H NMR and ^{13}C NMR, observing all the expected signals in the recorded spectra. Likewise elemental analyses were in accordance with the proposed structures. High resolution mass spectra was performed when the peak corresponding to $[\text{M}+\text{H}]^+$ was observed.

4.2 Synthesis and structural characterization of polytriazoles

For the synthesis of the 1,2,3-polytriazoles here described two methods of 1,3-dipolar cycloaddition reaction dialkyne/diazide monomers were followed: the Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) and the classical thermal Huisgen cycloaddition. As it was expected the CuAAC method

provided regioespecificity, thus 1,4-disubstituted triazoles forming part of the polymer chains were obtained. Instead thermally conducted cycloadditions afforded non-regioespecificity, so random 1,4- and 1,5-disubstituted polytriazole rings along the polymer chains were formed.

Three types of PT have been synthesised as a function of the starting dialkyne monomer —TA, DPL or DPN— and the chemical structures, which are related to the methods employed for the synthesis, are shown in Schemes 4.1-4.3. For the catalyzed CuAAC method, the corresponding dialkyne monomer was added to a suspension of the corresponding diazide monomer —IM, AIM, AM or DT— in a mixture of ^tBuOH-H₂O 1:1. Then CuSO₄ and sodium ascorbate were added and the mixture was stirred at 50 °C for 24 hours. Working up as described in Section 4.5.2 afforded PT as solids. In all cases, very high to quantitative yields were obtained.

On the other hand, for the thermal 1,3-dipolar cycloaddition reaction, a solution of the dialkyne derivative (TA, DPL or DPN) in dry CH₂Cl₂ was added to the corresponding diazide (IM, AM or DT) previously weighed into a round bottom flask, under argon. The solvent was swept into an argon stream and the reaction mixture was progressively heated from room temperature up to 55-60 °C. The resulting PT were finally dried *in vacuo*.

Abbreviations have been used to name PT, however they have been additionally numbered to facilitate their location. All of them were characterized by the usual spectroscopic techniques. Fully characterization of the PT by NMR spectroscopy is given in the Experimental Section. The molecular sizes were determined by GPC analysis and the results are collected in Tables 4.1-4.4.

4.2.1 Cationic poly(amido triazoles) and their *N*-Boc-protected precursors

The *N*-BocTA- and D-mannitol-based poly(amido triazoles) (**1-4**) were synthesised as described above, from medium to high molecular weights, and 73%-quantitative yields (Scheme 4.1 and Table 4.1). Removal of the *N*-Boc protecting groups of **1-4** by treatment with 4N HCl /dry dioxane afforded cationic PT (**5-8**) in 90%-quantitative yields, and their molecular weights are collected in Table 4.2.

4.2.1A *N*-protected poly(amido triazoles)

The chemical constitution of the *N*-protected poly(amido triazoles) (**1-4**) was confirmed by FTIR and NMR spectroscopies, and the corresponding data are detailed in the Experimental Section. They all presented similar IR spectra showing the characteristic absorption bands expected. No signals corresponding to azido or alkyne functional groups were detected in the polymeric materials. However, they showed absorption bands at ν_{\max} 1643-1652 and 1572-1577 cm^{-1} attributed to the amide I and amide II bands, respectively.

The NMR data were consistent with the chemical structures anticipated for these polymers. The ^1H NMR spectra of all of them showed a signal at δ 8.67-8.40 ppm attributed to the aromatic proton of the 1,4-disubstituted triazole ring. The PT obtained by thermal cycloaddition PT[1,4/1,5(BocTA-IM)] (**2**) and its *N*-deprotected derivative (**6**) also presented one additional signal at δ 8.14 and δ 8.29 ppm, respectively, associated to the aromatic proton of the 1,5-triazole ring. The integration of these signals permitted to establish the proportion of both 1,4/1,5-triazole regioisomers, which was 74% and 26%, respectively. The *HN*-Boc group was detected by signals at δ 6.64-6.66 ppm

and δ 1.34-1.36 ppm due to NH and $(CH_3)_3$, respectively. In the case of PT[1,4(BocTA-AIM)] (**3**) and PT[1,4(BocTA-AM)] (**4**), two singlets at δ 1.90-2.11 ppm of the acetyl groups were also displayed. For illustrative purposes 1H NMR of PT[1,4/1,5(BocTA-IM)] and PT[1,4/1,5(BocTA-IM)] are shown in the Spectra Appendix (Figure A14).

The ^{13}C NMR spectra also revealed the differences between the PT obtained by the regio- and non-regiospecific reactions. The 1,4-triazol constitution of **1** showed two signals at δ 127 and 142 ppm for both $C=CH$ contained in the polymer chains. However **2** showed two additional signals for $C=CH$ of the 1,5-triazol constitution at δ 133 and 131 ppm, not being part of the chains. By HETCOR experiments, the signals corresponding to CH_2NH of both constitutions were found to be overlapped with the water signal of the $DMSO-d_6$.

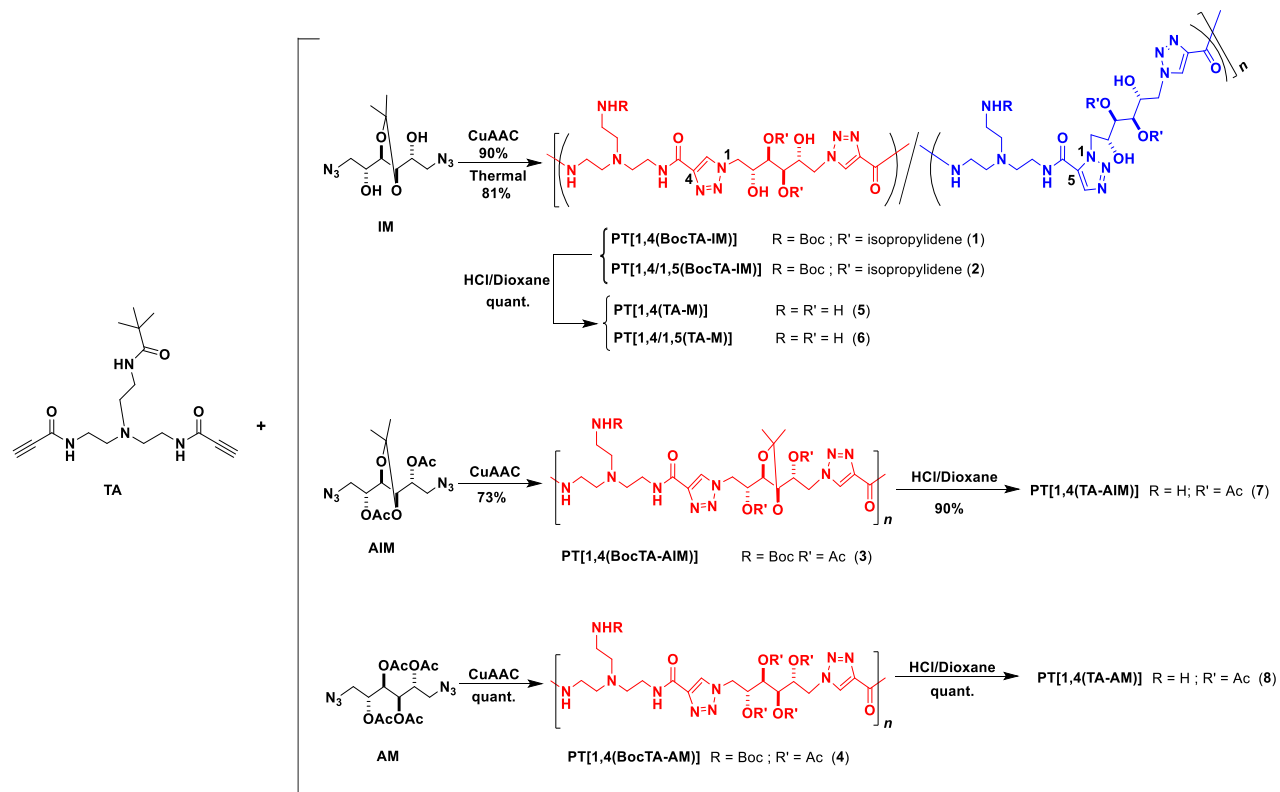
The *N*-Boc-protected PT obtained from TA and IM showed M_w in the range 43,000-44,700 $g\ mol^{-1}$ and narrow polydispersity. However, those PT based in *O*-acetyl derivatives (AIM and AM) presented much higher M_w , around 174,000 $g\ mol^{-1}$ (Table 4.1). The reason for these high molecular weights could be due to some physical interactions established between these PT and the stationary phase of the chromatographic system.

4.2.1B Cationic poly(amido triazoles)

The NMR spectra of cationic PT (**5-8**) showed that the *N*-protecting group had been efficiently removed, what was demonstrated by the disappearance of the signals corresponding to the $NHBoc$ group and the observation of a new signal at δ 8.8 ppm due to the NH_3^+ group. Likewise, the displacement of the CH_2 signals —of the TA moiety— from δ 2.50-2.75 to δ 3.20-3.75 ppm was also

observed. As an example of the *N*-Boc removal process, Figure A15 of the Spectra Appendix shows the ^1H NMR of PT[1,4(BocTA-AM)] and the corresponding cationic PT[1,4(TA-AM)]. Surprisingly the *N*-Boc deprotection of PT[1,4(BocTA-IM)] (**1**) and PT[1,4/1,5(BocTA-IM)] (**2**) took place with removal of the *O*-isopropylidene groups, what could be easily estimated by ^1H NMR for PT[1,4(TA-M)] (**5**) and PT[1,4/1,5(TA-M)] (**6**).

These cationic PT presented M_w ranging 30,000 g mol $^{-1}$, independently on the *N*-protected PT precursor (Table 4.2).



Scheme 4.1. Synthesis of cationic TA- and D-mannitol-based poly(amido triazoles) and their *N*-Boc derivative precursors.

Table 4.1. Yield and molecular weights of *N*-Boc-protected poly(amido triazoles) (1-4).

Polytriazole	Yield (%)	GPC		
		M_w^a	M_n^a	M_w/M_n^a
PT[1,4(BocTA-IM)] (1)	90	44,760	34,920	1.3
PT[1,4/1,5-[BocTA-IM]] (2) ^b	100	43,040	31,000	1.4
PT[1,4(BocTA-AIM)] (3)	73	175,571	173,828	1.0
PT[1,4(BocTA-AM)] (4)	100	172,962	170,984	1.0

^a Weight and number average molecular weight in g mol⁻¹ and polydispersity measured by GPC analysis in DMF/LiBr as mobile phase against polystyrene standards.

^b 1,4/1,5 ratio calculated by ¹H NMR: 76/24, respectively.

Table 4.2. Yield and molecular weights of cationic poly(amido triazoles) (5-8).

Polytriazole	Yield (%)	GPC		
		M_w^a	M_n^a	M_w/M_n^a
PT[1,4(TA-M)] (5)	100	29,730	27,290	1.1
PT[1,4/1,5(TA-M)] (6)	100	30,690	27,280	1.1
PT[1,4(TA-AIM)] (7)	90	26,400	25,500	1.0
PT[1,4(TA-AM)] (8)	100	27,600	26,300	1.0

^a Weight and number average molecular weight in g mol⁻¹ and polydispersity measured by GPC analysis in DMF/LiBr as mobile phase against polystyrene standards.

4.2.2. Non-cationic poly(ester triazoles)

A variety of poly(ester triazoles) based on dialkynyl derivatives DPL or DPN and D-mannitol-diazido derivatives IM, AIM and AM were synthesized as it is shown in Schemes 4.2 (9-13) and 4.3 (18-20), respectively. Removal of the *O*-protecting groups was accomplished as described in the Experimental Section. These PT were obtained in high yields and molecular sizes ranging from moderate to high M_w , depending on the molecular structures (Tables 4.3 and 4.4). For comparative purposes two additional PT lacking D-mannitol, just

based on DPN and DT (**19** and **20**) were also synthesized (Scheme 4.3 and Table 4.3).

The ^1H NMR spectra analysis of 1,4-constituted PT showed only one signal in the interval δ 8.00-8.82 ppm, due to the C=CH of the triazole ring. Those PT having 1,4/1,5 constitution showed an additional signal in the range δ 8.26-7.75 ppm. The ratio of the regioisomer mixture could be calculated from the integration of the corresponding aromatic protons, which is given in Table 4.3; in general, the ratio 1,4/1,5-regioisomer oscillated from 90/10 to 67/33, respectively.

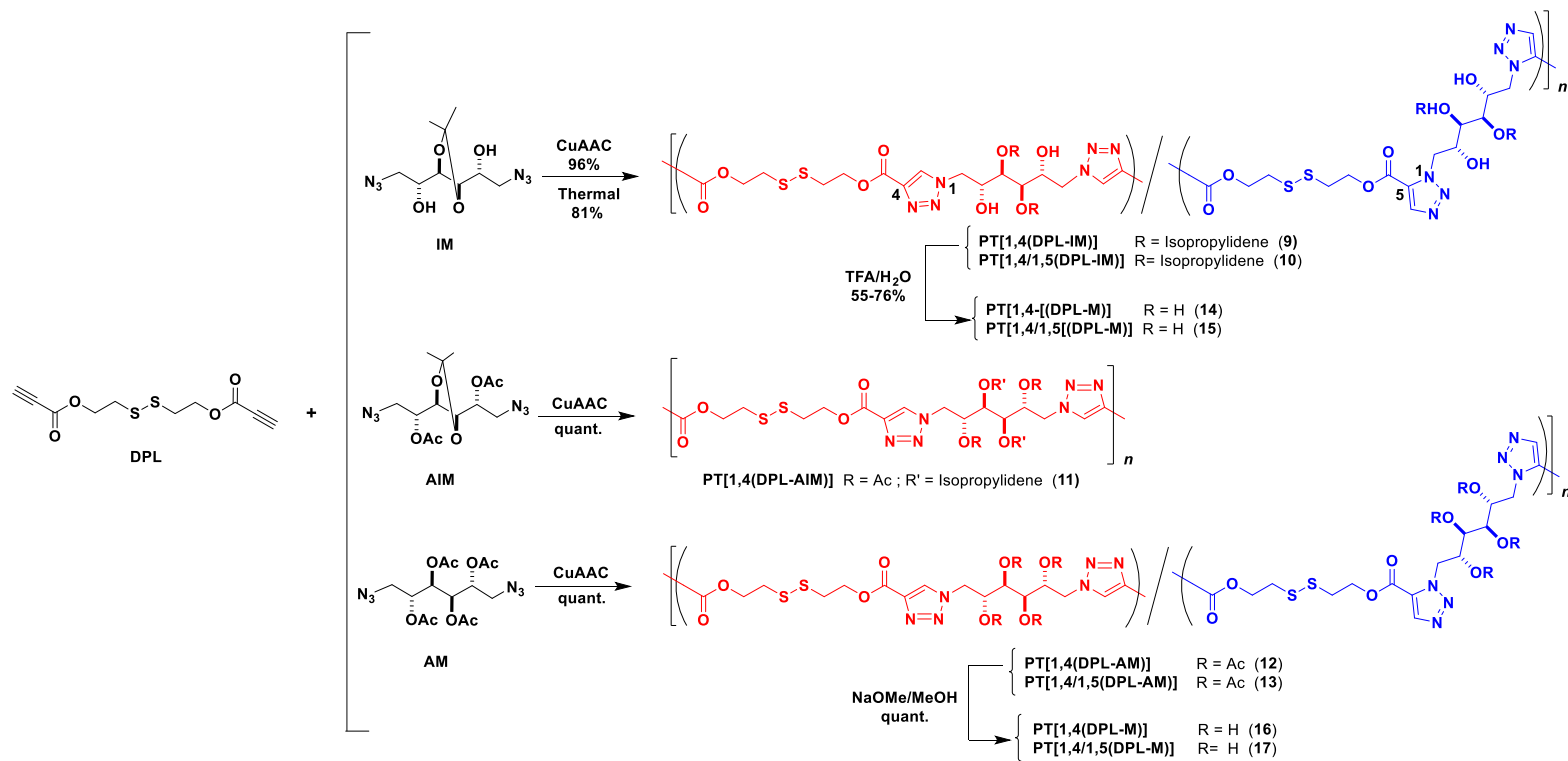
The ^1H NMR spectra showed signals corresponding to the *O*-protecting groups at δ 1.40 ppm (isopropylidene group of **9-11**, **18**) and δ 1.77-2.15 ppm (acetyl group of **11-13**). On the other hand, the ^{13}C NMR spectra were in accordance with the proposed structures for the new PT. As expected, those PT obtained by CuAAC method showed two signals at δ 130 and 138 ppm (due to the C=CH of the 1,4-substituted triazole), while the thermal cycloaddition reaction showed duplicated signals for both constitutions 1,4/1,5 of the triazole rings.

Removal of the *O*-isopropylidene group of PT was attained by treatment of the corresponding PT with trifluoroacetic acid-water, as described in Experimental Section, and the reaction was followed by ^1H NMR. In these cases, a displacement of the signals due to H-3 and H-4 of the unprotected D-mannitol moieties was observed at higher δ 3.35-3.57 ppm, when compared with the parent compounds. No signals due to free hydroxyl groups were observed because they were overlapped by the accompanying water signal of the deuterated solvent. Data related with yield and molecular weights of *O*-deprotected PT **14**, **15** and **21** are collected in Table 4.4.

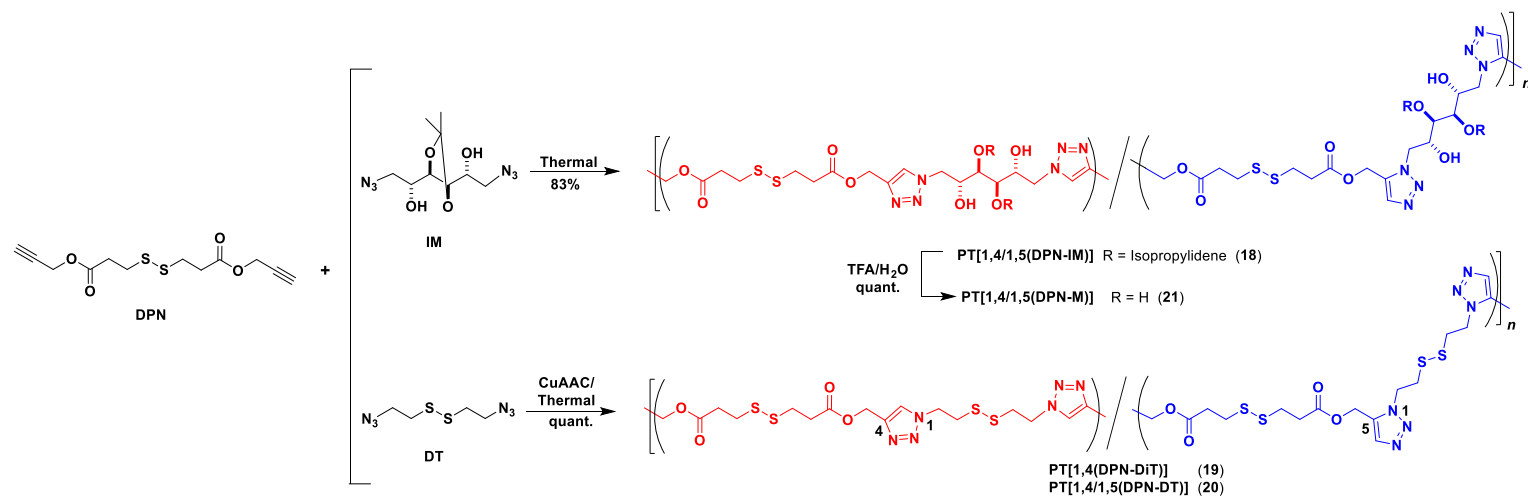
Deacetylation of PT[1,4(DPL-AM)] (**12**) and PT[1,4/1,5(DPL-AM)] (**13**) was achieved by treatment with sodium methoxide in methanol to obtain **16** and **17**, respectively (Table 4.4). The ^1H NMR spectra of the latest showed a displacement of the signals due to H-2, H-3, H-4 and H-5 (D-mannitol moiety) up to δ 3.94-3.48 ppm. This process was accompanied by the partial saponification of the polymer chains, which could reach up to 20 % approximately.

As mentioned before PT based on DPN and DT (**19** and **20**) were also synthesized and their structures were studied by NMR, the corresponding data are described in Experimental Section, and they were in accordance with the proposed structures. ^1H NMR of **19** and **20** are shown in the Spectra Appendix (Figure A16).

In general, *O*-deprotection processes led to a decrease in molecular weights. As mentioned above a certain grade of degradation was observed in some cases but the measure of molecular sizes by GPC must be also taken into account.



Scheme 4.2. Synthesis of DPL- and D-mannitol-based poly(ester triazoles) and their corresponding *O*-deprotected derivatives.



Scheme 4.3. Synthesis of DPN-based poly(ester triazoles).

Table 4.3. Yield and molecular weights of *O*-protected DPL- and DPN-based poly(ester triazoles) (**9-13** and **18-20**, respectively).

Polytriazole	Yield (%)	1,4/1,5 ratio ^b	GPC		
			M_w^a	M_n^a	M_w/M_n^a
PT[1,4(DPL-IM)] (9)	96	100/0	84,000	66,400	1.3
PT[1,4/1,5(DPL-IM)] (10)	81	90/10	31,700	27,000	1.2
PT[1,4(DPL-AIM)] (11)	95	100/0	179,300	109,300	1.6
PT[1,4(DPL-AM)] (12)	95	100/0	96,900	69,600	1.4
PT[1,4/1,5(DPL-AM)] (13)	96	90/10	60,700	45,800	1.3
PT[1,4/1,5(DPN-IM)] (18)	83	67/33	59,800	44,300	1.3
PT[1,4(DPN-DT)] (19)	94	100/0	59,900	43,500	1.4
PT[1,4/1,5(DPN-DT)] (20)	93	59/41	17,200	16,300	1.0

^a Weight and number average molecular weight in g mol⁻¹ and polydispersity measured by GPC analysis in DMF/LiBr as mobile phase against polystyrene standards.

^b Calculated by ¹H NMR.

Table 4.4. Yield and molecular weights of *O*-deprotected DPL- and DPN-based poly(ester triazoles) (**14-17** and **21**, respectively).

Polytriazole	Yield (%)	GPC		
		M_w^a	M_n^a	M_w/M_n^a
PT[1,4(DPL-M)] (14)	55	20,930	19,530	1.1
PT[1,4/1,5(DPL-M)] (15)	76	25,350	21,760	1.2
PT[1,4(DPL-M)] (16)	100	10,580	8,020	1.3
PT[1,4/1,5(DPL-M)] (17)	100	8,070	6,470	1.2
PT[1,4/1,5(DPN-M)] (21)	100	45,870	37,230	1.2

^a Weight and number average molecular weight in g mol⁻¹ and polydispersity measured by GPC analysis in DMF/LiBr as mobile phase against polystyrene standards.

4.3 Thermal properties

The thermal behavior of the new PT described in this chapter has been comparatively examined by TGA and DSC, and the thermal parameters resulting from this study are collected in Tables 4.5-4.8.

4.3.1 Cationic poly(amido triazoles) and their precursors

First of all the thermal properties of the *N*-Boc protected TA- and -D-mannitol-based poly(amido triazoles) (**1-4**) are going to be discussed (Table 4.5). By TGA studies, thermal decomposition of these PT started to be detectable at about 175 °C, with onset temperatures (measured for 10% of weight loss) between 175 and 222 °C. Decomposition processes took place in two or three stages, with maximum degradation rate in the range 310–343 °C, with residues of 15-29% of the initial weight. The DSC heating of these PT showed T_g values ranging from 35 to 93 °C but they did not show any endothermic peaks associated to melting processes, manifesting an essentially amorphous behavior. For PT[1,4(BocTA-IM)] (**1**) and PT[1,4/1,5(BocTA-IM)] (**2**) obtained by catalytic and thermal cycloadditions, respectively, the T_g was practically doubled for the latter. The presence of *O*-acetyl groups in the D-mannitol moiety led to an increase of T_g values of the corresponding polymers (**3** and **4**) compared to **1**.

Table 4.5. Thermal properties of N-Boc-protected poly(amido triazoles) (**1-4**).

Polytriazole	TGA			DSC
	T_d^a (°C)	T_{ds}^b (°C)	ΔW^c (%)	T_g^d (°C)
PT[1,4(BocTA-IM)] (1)	175	113/215/343	96/81/18	35
PT[1,4/1,5(BocTA-IM)] (2)	222	236/343	78/15	64
PT[1,4(BocTA-AIM)] (3)	178	194/247/336	92/88/29	55
PT[1,4(BocTA-AM)] (4)	203	252/310	83/22	93

^a Temperature at which 10% weight loss was observed in the TGA traces recorded at 10 °C min⁻¹.^b Temperature for maximum degradation rate.^c Remaining weight at 600 °C.^d Glass transition temperature taken as the inflection point of the heating DSC traces of melt-quenched samples recorded at 20 °C min⁻¹.**Table 4.6.** Thermal properties of cationic poly(amido triazoles) (**5-8**).

Polytriazole	TGA			DSC
	T_d^a (°C)	T_{ds}^b (°C)	ΔW^c (%)	T_g^d (°C)
PT[1,4(TA-IM)] (5)	151	333	15	63
PT[1,4/1,5(TA-IM)] (6)	160	336	22	44
PT[1,4(TA-AIM)] (7)	169	328	29	89
PT[1,4(TA-AM)] (8)	166	322	26	48

^a Temperature at which 10% weight loss was observed in the TGA traces recorded at 10 °C min⁻¹.^b Temperature for maximum degradation rate.^c Remaining weight at 600 °C.^d Glass transition temperature taken as the inflection point of the heating DSC traces of melt-quenched samples recorded at 20 °C min⁻¹.

On the other hand, the cationic D-mannitol-based poly(amido triazoles) (**5-8**) (Table 4.6) exhibited a similar decomposition pattern. They all showed thermal decomposition in the interval 151-169 °C (10% weight loss) and the maximum degradation rate took place in a single stage in the range 322 °C to 336 °C, with residues of initial weight of 15-29%. Thus cationic PT presented simpler patterns than

their corresponding *N*-Boc PT precursors. From the DSC studies, T_g values between 44 °C and 89 °C were found and they did not show any endotherm peaks associated to melting process.

4.3.2 Non-cationic poly(ester triazoles)

The thermal data summarized in Table 4.7 correspond to poly(ester triazoles) based on dialkyne DPL and the 1,6-diazido derivatives of D-mannitol (IM, AIM and AM) (**9-13**), as well as those based on dialkyne DPN and IM or DT (**18-20**). No significant difference in the thermal behavior of regioespecific and non-regioespecific PT was found. Apart from PT[1,4(DPL-IM)] (**9**), which decomposed in three steps, all the others decomposed in one single step above 254 °C up to 342 °C. The T_g values of any D-mannitol-based PT oscillated between 52 °C and 100 °C. The amorphous character of these materials was confirmed by the absence of any process associated to melting. Conversely PT based on DPN-DT, lacking D-mannitol (**19** and **20**), showed much lower T_g values, 8 °C and 11 °C, respectively. They also showed signs of semicrystallinity showing melting temperature in the range 120 °C-140 °C.

As it was already mentioned above removal of the *O*-protecting groups of selected D-mannitol-based PT was successfully achieved, and the results of the thermal studies of PT **14-17** and **21** are shown in Table 4.8. The PT **14/16** and **15/17** (presenting similar structures) were obtained by different synthetic routes, as a function of the starting monomer [(IM) or (AM)] used, respectively (Scheme 4.2). As it can be seen a very close similarity was found for similar materials concerning decomposition processes (T_d and T_{ds}); the exception was PT[1,4/1,5(DPL-M)] (**17**), for which no T_g was observed. Finally, PT **21** derived from DPN showed T_g 9 °C, and T_m 119 °C.

Table 4.7. Thermal properties of poly(ester triazoles) based on DPL and DPN (**9-13** and **18-20**).

Polytriazole	TGA			DSC		
	T_d^a (°C)	$T_{ds}^{b,c}$ (°C)	$\Delta W^{c,d}$ (%)	T_g^e (°C)	T_m^f (°C)	ΔH_m^f (J g ⁻¹)
PT[1,4(DPL-IM)] (9)	214	228/288/324	83/78/26	100		
PT[1,4/1,5(DPL-IM)] (10)	264	317	16	77		
PT[1,4-[DPL-AIM)] (11)	133	335	20	53		
PT[1,4(DPL-AM)] (12)	217	254	15	58		
PT[1,4/1,5(DPL-AM)] (13)	262	342	14	75		
PT[1,4/1,5(DPN-IM)] (18)	261	331	23	52		
PT[1,4(DPN-DT)] (19)	270	326	22	8	140	32
PT[1,4/1,5(DPN-DT)] (20)	265	322	20	11	76/121	5/48

^a Temperature at which 10% weight loss was observed in the TGA traces recorded at 10 °C min⁻¹.

^b Temperature for maximum degradation rate.

^c Values in bold correspond to the most important thermal transitions observed for the different polymers.

^d Remaining weight at 600 °C.

^e Glass transition temperature taken as the inflection point of the heating DSC traces of melt-quenched samples recorded at 20 °C min⁻¹.

^f Melting temperature (T_m) and respective enthalpy (ΔH_m) measured by DSC at a heating rate of 10 °C min⁻¹.

Table 4.8. Thermal properties of *O*-deprotected D-mannitol-based poly(ester triazoles) (**14–17** and **21**).

Polytriazole	TGA			DSC		
	T_d^a (°C)	T_{ds}^b (°C)	ΔW^c (%)	T_g^d (°C)	T_m^e (°C)	ΔH_m^e (J g ⁻¹)
PT[1,4(DPL-M)] (14)	114	270	13	85		
PT[1,4/1,5(DPL-M)] (15)	243	326	13	55		
PT[1,4(DPL-M)] (16)	231	331	29	84		
PT[1,4/1,5(DPL-M)] (17)	245	290	19	-		
PT[1,4/1,5(DPN-M)] (21)	238	313	18	9	119	36

^a Temperature at which 10% weight loss was observed in the TGA traces recorded at 10 °C min⁻¹.

^b Temperature for maximum degradation rate.

^c Remaining weight at 600 °C.

^d Glass transition temperature taken as the inflection point of the heating DSC traces of melt-quenched samples recorded at 20 °C min⁻¹.

^e Melting temperature (T_m) and respective enthalpy (ΔH_m) measured by DSC at a heating rate of 10 °C min⁻¹.

4.4 Biological studies of cationic poly(amido triazoles)

4.4.1 Size and zeta potential

Physicochemical properties of the complexes between cationic polymer and nucleic acids —polyplexes— are very important features that can influence in their transfection efficiency. Zeta potential is an important factor for characterizing the surface charges of polyplexes. The interaction between polyplexes and anionic cells membranes are electrostatic, and this interaction must be encouraged to facilitate sufficient cellular uptake.

First, the capability of cationic poly(amido triazoles) to form polyplexes with linear DNA (Calf Thymus DNA), at N/P ratios 1, 2, 5 and 10, was studied. The average hydrodynamic sizes and the neat surface charge of these Linear PT/DNA polyplexes were evaluated by dynamic light scattering (DLS). As shown in Figure 4.1, the average sizes of polyplexes formed with PT **5**, **6**, **7** and **8** showed nano-sized particles in the range 60-140 nm, with polydispersity index (PDI) below 0.3, which indicated narrow populations of nanoparticles.

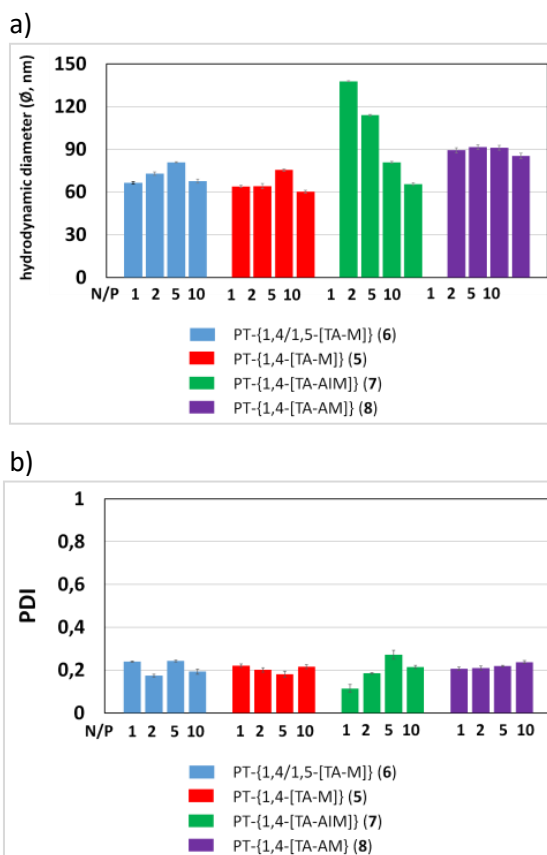


Figure 4.1. Average size (hydrodynamic diameters) (a) and polydispersity (b) of Linear PT(5-8)/DNA polyplexes at N/P ratios 1, 2, 5 and 10. Standard deviation is plotted with error bars in the graphs.

To evaluate the transfection ability of the cationic polytriazoles, polyplexes with circular DNA (pEGFP), at the same N/P ratios, were also prepared and characterized by DLS. As shown in Figure 4.2, the average sizes of Circular PT/DNA polyplexes formed with PT 5, 6, 7 and 8 were higher than the corresponding Linear PT/DNA polyplexes, but they were also nano-sized particles, below 400 nm, with potential transfect capacity in cells. The sizes of these Circular PT/DNA polyplexes increased as the N/P ratio also increased. However, PT 8/DNA polyplex did not show a linear tendency, in this case, the highest size was found at N/P ratio 2, and the lowest one at N/P ratio 5. The

measurements of PDI were also higher than those of Linear PT/DNA polyplexes, but most of them lower than 0.6 (Figure 4.2).

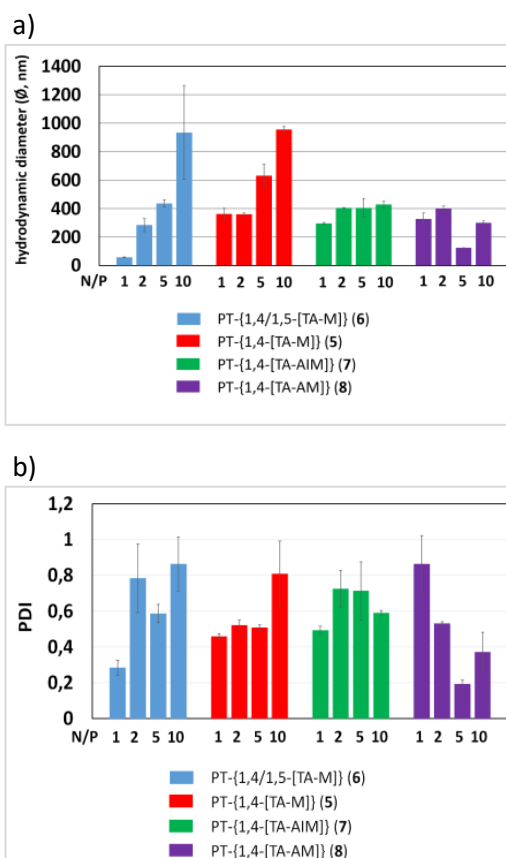


Figure 4.2. Average hydrodynamic size (a) and polydispersity (b) of Circular PT (5-8)/DNA polyplexes at N/P ratios 1, 2, 5 and 10. Standard deviation is plotted with error bars in the graphs.

As shown in Figure 4.3 (a), all Linear PT/DNA polyplexes exhibited positive ζ potential so they would easily interact with the negative cell membranes. In contrast, Circular PT/DNA polyplexes showed negative ζ potential in the range of -55.5-(-3.3) mV [(Figure 4.3 (b))]. In both cases, the ζ potential values did not depend on the N/P ratio, which indicated that the complex

stoichiometry did not change significantly when the N/P ratio increased, with the exception of PT-{1,4-[TA-AlM]} (**7**) and PT-{1,4-[TA-AM]} (**8**) at N/P 10.

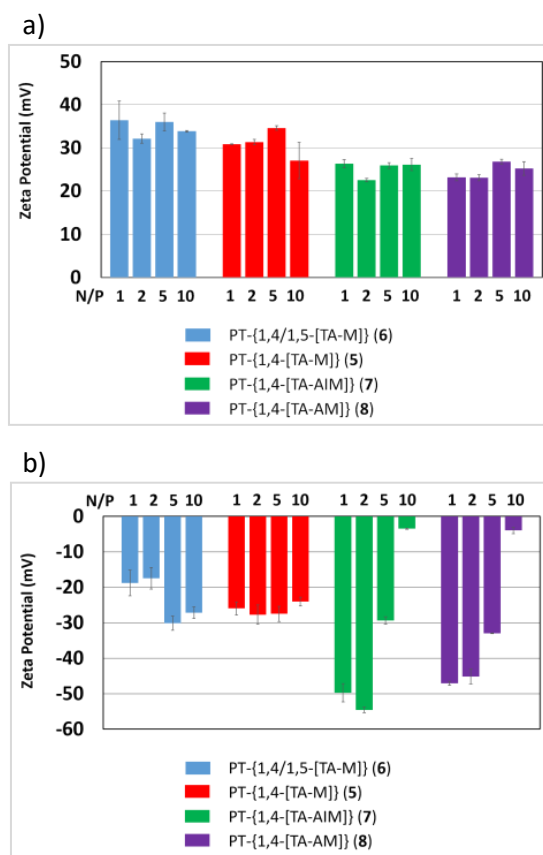


Figure 4.3. ζ potential measurements (mV) of (a) Linear PT (**5-8**)/DNA; (b) Circular PT (**5-8**)/DNA polyplexes.

4.4.2 In vitro transfection biology

The biological transfection assays were carried out in the Centre for Stem Cell Biology (CSCB) within the Department of Biomedical Sciences located at Alfred Denny Building in the University of Sheffield. As an initial attempt to identify the ability of cationic poly(amido triazoles) to transfect hESCs, they

were compared with the typical gold standard lipid-based method Lipofectamine® 2000. A reporter plasmid that expressed EGFP in transfected cells, which could be detected using epifluorescence microscopy analysis was used to evaluate the transfection efficiency. During complexation, the size of DNA plasmid has been related to transfection efficiency (Kreiss *et al.*, 1999). Also, the ability of cationic polymers to efficiently complexate DNA, which also affects the final particle size and transfection efficiency, is dependent on the ratio moles of amine groups of the cationic polymers to those of the phosphate of the DNA (N/P ratio) (Zhao *et al.*, 2009). Therefore, it was important to test N/P ratios from 1-10 in transfection as previously tested during physicochemical characterization with Linear DNA. Experiments were performed in triplicate cells. Micrographs of polytriazole-transfected hESCs showed comparable levels of transfection to those seen on the positive control (Lipofectamine® 2000) in some cases (Figure 4.4). Interestingly, Circular PT **7**/DNA was the best performing transfection agent in every N/P ratio tested (Figure 4.4 C-F). Nevertheless, positive results for transfection were observed with PT **8**/DNA at N/P1 and N/P5 ratios (Figure 4.4 G and K). A lower level of transfection than the control but still positive for EGFP expression were found for polyplexes from PT **8** at N/P2 and N/P10 (Figure 4.4 H and J); PT **6**/DNA at N/P1 and N/P2 (Figure 4.4 K and L) and PT **5**/DNA at N/P2 (Figure 4.4 P). The size of the particles upon complexation had an effect on transfection efficiency, none of the complexes with size above 400 nm [Figure 4.2 (a)] were able to transfect hESCs. This was somewhat expected, given that previous work had demonstrated that nanoparticles smaller than 400 nm being more favorable for increased transfection efficiency in hESCs (Green *et al.*, 2008).

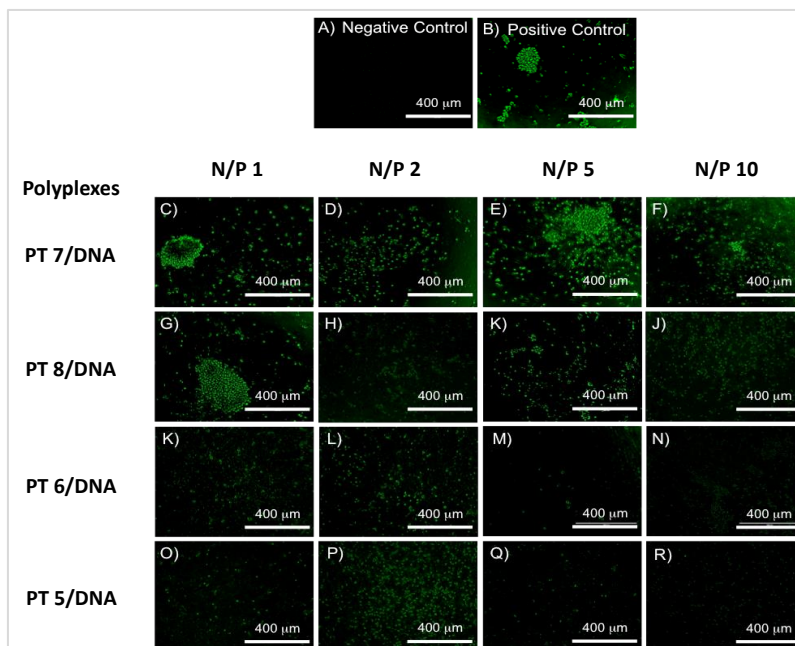


Figure 4.4. EGFP expression in hPSCs transfected with polytriazole (5-8)/pEGFP-C2 complexes. A) Negative control (no transfection); B) positive control (transfection with Lipofectamine 2000); C-F) transfection results for PT 7/DNA polyplexes; G-J) transfection results for PT 8/DNA polyplexes; K-N) transfection results for PT 6/DNA polyplexes; O-R) transfection results for PT 5/DNA polyplexes. N/P ratios 1, 2, 5 and 10.

4.4.3 Cytotoxicity studies

Cytotoxicity is considered to be a key issue in gene delivery because good gene carriers should exhibit low cytotoxicity. Thus, the potential toxic effects of the new cationic polytriazoles PT[1,4(TA-M)] (5), PT[1,4/1,5(TA-M)] (6), PT[1,4(TA-AIM)] (7) and PT[1,4(TA-AM)] (8), have been studied on different human cancer cell lines (A-549, MCF7, HEP G2 and LS 180), and a normal cell line (REP-1). Due to the low solubility in water of these materials, the PT solutions were prepared in 4% DMSO-water. Figure 4.5 shows the results on cell viability of DMSO-water at different concentrations after incubation after 96 h.

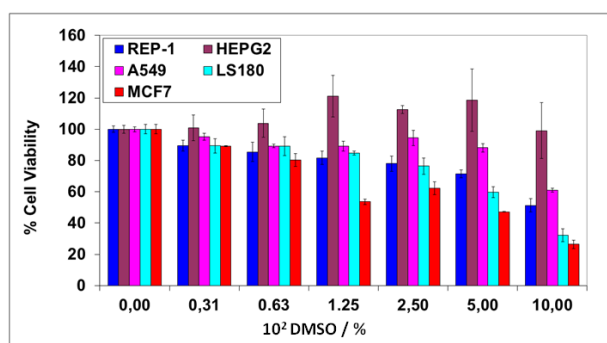


Figure 4.5. Cell viability (%) in the presence of different DMSO-water concentrations for different cancer cell lines after 96 h.

The results concerning the viability of cell growth in the presence of polymers **5-8** at different concentrations, after 96 h of incubation, are shown in Figure 4.6. A similar cytotoxicity profile can be observed for all the PT in all cell lines tested, decreasing cell viability as the polymer concentration increased. PT[1,4/1,5(TA-M)] (**5**) showed the highest cell viability level at any concentration, reaching more than 60 % at concentrations of 7.5 mg mL⁻¹ for cancer cell lines A549, LS180 and for the normal retinal epithelial cell (REP-1), what may be due to the absence of copper. In the case of the human liver cancer line (HEP G2), viability over 100% was observed for **5**, **6** and **7**, which could be explained as a consequence of cellular stress processes (Bravo *et al.*, 2012; Rai *et al.*, 2018).

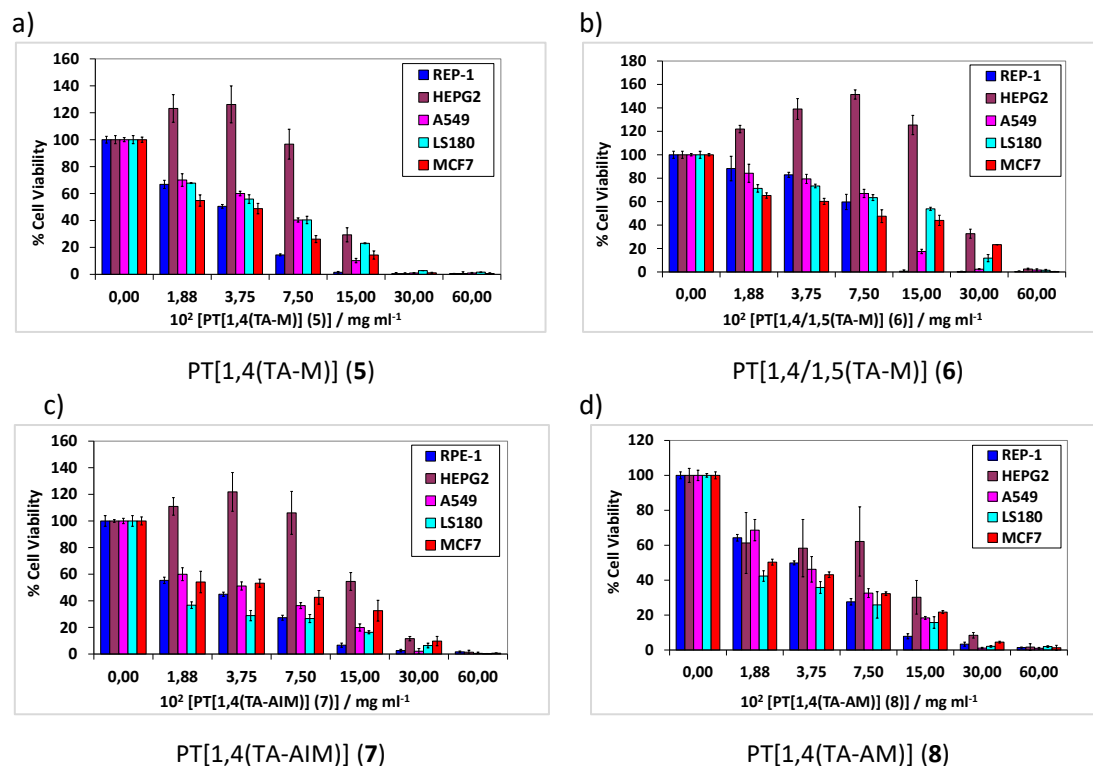
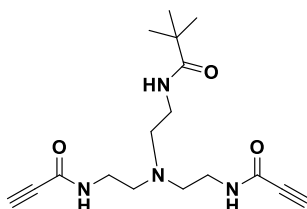


Figure 4.6. Cell viability (%) in the presence of a) PT[1,4(TA-M)] (5); b) PT[1,4/1,5(TA-M)] (6); c) PT[1,4(TA-AIM)] (7); d) PT[1,4(TA-AM)] (8) at different concentrations for different cancer cell lines after 96 h.

4.5 Experimental section

4.5.1 Monomers

Bis-(2-aminoethyl)-2-(*tert*-butoxycarbonylamine)ethylpropiolamide (TA)



To a solution of commercial tris-(2-aminoethyl)amine (10 g, 68.5 mmol) in dioxane (61.5 mL) was added a solution of di-*tert*-butyl-dicarbonate (2.39 g, 10.9 mmol) in dry dioxane (61.5 mL) dropwise over 1 hour under an inert argon atmosphere. The reaction mixture was stirred for 16 hours at room temperature, and then evaporated under reduced pressure. The obtained residue was dissolved in water (26 mL) and extracted repeatedly with CH₂Cl₂ (40 mL), until the thin layer chromatography of the organic phase indicated that there was no product left to extract (acetonitrile-water-ammonium hydroxide, 10:2:1). Finally, the combined organic extracts were dried with sodium sulphate and concentrated to dryness to give a slightly coloured syrup (3.1 g, 100%) whose physical characteristics were identical to those described in the literature (Benito *et al.*, 2004) for bis-(2-aminoethyl)-2-(*tert*-butoxycarbonylamine)ethylamine.

¹H NMR (MeOD, 300 MHz): δ (ppm) 1.46 (s, 9H, CH₃), 2.54 (t, 6H, J = 6.1 Hz, CH₂N), 2.70 (t, 4H, J = 6.4 Hz, CH₂NH₂), 3.12-3.16 (m, 2H, CH₂NH).

¹³C NMR (MeOD, 75 MHz): δ (ppm) 28.8 (CH₃), 39.7 (CH₂NHBoc), 40.2 (CH₂NH₂), 55.5 (NCH₂CH₂NHBoc), 58.0 (NCH₂CH₂NH₂), 80.0 [C(CH₃)₃], 158.6 (CO).

On the other hand to a solution of *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (7.76 g, 37.6 mmol) in CH_2Cl_2 (90 mL) cooled to 0 °C under an inert atmosphere, propiolic acid (2.35 g, 33.5 mmol) was added and stirred for 2 hours. Then a solution of bis-(2-aminoethyl)-2-(*tert*-butoxycarbonylamine)ethylamine (1.67 g, 7.5 mmol) in dichloromethane (300 mL) was added dropwise during 45 minutes at 0-10 °C and the reaction mixture was stirred at the same temperature for 2 hours, and then at room temperature for 24 hours more. Finally the formed salts were filtered, the solvent was removed and the residue was purified by column chromatography using an elution gradient of 0-4% methanol-chloroform, to give an orange solid which was characterized as the title compound (0.805 g, 30.7%); m.p. 51-53 °C.

IR: ν_{max} (cm^{-1}) 3239 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 2106 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 1632 (amide I), 1522 (amide II).

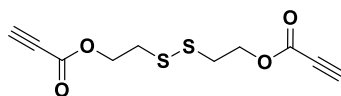
^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ (ppm) 1.49 (s, 9H, CH_3), 2.56 (t, 2H, $J = 5.3$ Hz $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}Boc$), 2.62 (t, 4H, $J = 5.6$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 2.79 (s, 2H, CH), 3.19-3.20 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{NH}Boc$), 3.37 (c, 4H, $J = 11.1$ and 5.6 Hz CH_2NHCO), 4.92 (s, 1H, $\text{NH}Boc$) 7.08 (s, 2H, NHCOCCH).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ (ppm) 28.4 (CH_3), 38.0 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 39.0 ($\text{CH}_2\text{NH}Boc$), 53.4 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}Boc$), 55.8 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 73.5 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 77.4 ($\text{C}\equiv\text{CH}$) 79.8 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 152.7 ($\text{COC}\equiv\text{CH}$), 156.9 [$\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$].

ESI-MS: m/z 351.20 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$.

Anal. calc. for $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_4$: C, 58.10; H, 7.74; N, 15.94. Found: C, 57.51; H, 7.31; N, 15.85.

2,2'-Dithiodiethanol dipropiolate (DPL)



A mixture of propiolic acid (3.11 g, 44.4 mmol), *p*-toluenesulfonic acid (150 mg), 2,2'-dithiodiethanol (3.11 g, 20.2 mmol) and toluene (75 mL) was refluxed using a Dean Stark apparatus for 24 hours. Then the solvent was evaporated and the residue was diluted with dichloromethane and the solution obtained was washed with a saturated solution of sodium bicarbonate. The organic layer was dried with anhydrous sodium sulphate, filtered and evaporated to dryness. Finally, the residue obtained was purified by column chromatography using a mixture of ethyl acetate-hexane 1:6 as eluent, to give the title compound as a liquid (2.23 g, 43%).

IR: ν_{\max} (cm⁻¹) 3272 (C≡CH), 2119 (C≡C), 1707 (C=O).

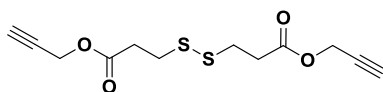
¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ (ppm) 2.95 (s, 2H, CH), 3.00 (t, 4H, *J* = 6.6 Hz, SCH₂), 4.48 (t, 4H, *J* = 6.6 Hz, CH₂O).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ (ppm) 36.6 (CH₂S), 63.9 (CH₂O), 74.3 (C≡CH), 75.4 (C≡CH), 171.6 (CO).

ESI-MS: *m/z* 280.8 [M + Na]⁺.

Anal. calc. for C₁₀H₁₀O₄S₂: C, 46.50; H, 3.90; S, 24.83. Found: C, 46.82; H, 4.10; S, 24.84.

Dipropargyl 3,3'-dithiodipropionate (DPN)



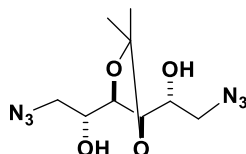
A solution of 2,2'-dithiopropionic acid (3 g, 14.25 mmol) and propargyl alcohol (1.6 g, 28.5 mmol) in anhydrous THF (40 mL) was treated with *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (5.9 g, 28.5 mmol) and 4-(dimethylamino)pyridine (0.35 g, 2.85 mmol) for 36 hours. After this time, the salts formed were filtered. The filtrate was concentrated to dryness and dissolved in CH₂Cl₂. The obtained residue was washed with 1M HCl (200 ml),

1M NaOH (200 ml), and with a saturated NaCl solution (300 ml), successively. The organic phase was dried with anhydrous sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. Finally, the residue obtained was purified by column chromatography using CH_2Cl_2 as eluent, to give the title compound as a liquid (2.7 g, 69%). The physical characteristics were identical to those described in the literature (Han *et al.*, 2012).

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ (ppm) 2.45-2.52 (t, $J = 2.51$ Hz, 2H, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 2.73-2.84 (m, 2H, CH_2CO), 2.87-2.98 (m, 2H, SCH_2), 4.68-4.71 (d, 4H, CH_2O).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ (ppm) 32.8 (CH_2S), 33.8 (CH_2CO), 52.3 (CH_2O), 75.1 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 77.4 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 170.9 (CO).

1,6-Diazido-1,6-dideoxy-3,4-*O*-isopropylidene-D-mannitol (IM)



To a stirred solution of IpMan (section 3.3.1 of this thesis, 2.22 g, 10 mmol) in dry pyridine (32 mL) was added tosyl chloride (3.9 g, 20.5 mmol) in small portions at -5°C and was maintained at 0°C during the following 4 hours. It was then treated with 6N hydrochloric acid (64 mL) and TBME (30 mL). The organic phase was separated, washed with a saturated solution of sodium bicarbonate (40 mL), dried with anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness. The residue obtained was purified by column chromatography using CH_2Cl_2 -TBME 4:1 and TBME as eluent, obtaining the di-*O*-tosyl presursor in a yield of 40% (2.2 g). The physical characteristics were identical to those described in the literature for this compound, m.p. $88-89^\circ\text{C}$. Lit. 86°C (Le Merrer *et al.*, 1987).

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ (ppm) 1.28 (s, 6H, CH_3), 2.46 [s, 6H, $\text{SO}_2(\text{C}_6\text{H}_4)\text{CH}_3$], 3.79-3.83 (m, 6H, H-2, H-3, H-4, H-5, OH), 4.09 (dd, 2H, $J = 10.4$ and 5.2 Hz, H- $1_{a/b}$, H- $6_{a/b}$), 4.33 (dd, 2H, $J = 10.4$ and 1.3 Hz, H- $1_{a/b}$, H- $6_{a/b}$), 7.37 (d, 4H, $J = 7.9$ Hz, CHCCH_3), 7.82 (d, 4H, $J = 8.2$ Hz, CHCS).

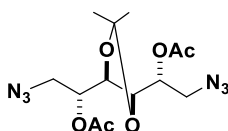
^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ (ppm) 21.7 [$\text{SO}_2(\text{C}_6\text{H}_4)\text{CH}_3$], 26.6, 27.0 (CH_3), 71.0, 71.5 (C-2, C-5), 79.0 (C-3, C-4), 110.2 [$\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 128.0, 130.0, 132.5, 145.0 [$\text{SO}_2(\text{C}_6\text{H}_4)\text{CH}_3$].

Then, a mixture of this ditosyl derivative (4.47 g, 8 mmol) and sodium azide (2.10 g, 32 mmol) in DMF (32 mL) was heated at 70°C for 3 hours and then the DMF under vacuo was removed at room temperature. The resulting residue was treated with water and CH_2Cl_2 , the organic phase was separated, dried with anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated. The obtained residue was purified by column chromatography using TBME-hexane 1:4 as eluent to give the title compound as a slightly colored liquid (1.06 g, 50%), whose physical characteristics were identical to those described in the literature (Le Merrer *et al.*, 1987).

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ (ppm) 1.38 (s, 6H, CH_3), 3.46 (dd, 2H, $J = 12.8$ and 5.4 Hz H-2, H-5), 3.65 (dd, 2H, $J = 12.8$ and 2.3 Hz, H-3, H-4), 3.74-3.87 (m, 4H, H- $1_{a/b}$, H- $6_{a/b}$), 4.19 (s, 2H, OH).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ (ppm) 26.7 (CH_3), 54.2 (C-1, C-6), 72.2 (C-2, C-5), 80.1 (C-3, C-4), 109.9 [$\text{C}(\text{CH}_3)_2$].

2,5-Di-O-acetyl-1,6-diazido-1,6-dideoxy-3,4-O-isopropylidene-D-mannitol (AIM)



A stirred solution of IM (1.48 g, 5.46 mmol) in dry pyridine (11.5 mL) was cooled in an ice bath and acetic anhydride was added dropwise (11 mL). After 15 min the reaction mixture was led to reach the room temperature, and stirring was continued for 24 hours. The mixture was poured into an ice-water mixture (240 mL), extracted with CH_2Cl_2 (240 mL) and the organic phase was washed successively with a 10% HCl solution, water, saturated sodium bicarbonate solution and water. Finally, the organic phase was dried with anhydrous sodium sulphate, filtered and concentrated to dryness. The residue obtained was purified by column chromatography using a mixture of ethyl acetate-hexane 1:6 as eluent to give a colourless liquid (1.44 g, 74%).

IR: ν_{max} (cm^{-1}) 2098 (N_3), 1743 (CO).

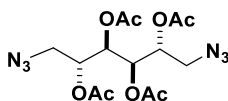
^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ (ppm) 1.43 (s, 6H, COCH_3), 2.19 (s, 6H, CH_3), 3.55-3.60 (m, 4H, H-1_{a/b}, and H-6_{a/b}), 4.09 (dd, 2H, $J = 1.70$ and 4.32 Hz, H-3 and H-4), 5.05-5.11 (m, 2H, H-2 and H-5).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ (ppm) 20.9 (COCH_3), 27.0 (CH_3), 50.4 (C-1, C-6), 72.8 (C-2, C-5), 77.3 (C-3, C-4), 111.4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 170.1 (CO).

ESI-MS: m/z 379.13 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$.

Anal. calc. for $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_6$: C, 43.82; H, 5.66; N, 23.58. Found: C, 43.07; H, 5.41; N, 22.81.

2,3,4,5-Tetra-*O*-acetyl-1,6-diazido1,6-dideoxy-D-mannitol (AM)



To a suspension of D-mannitol (5 g, 27.4 mmol) in dry dioxane (72 mL) was added acetyl bromide (4.95 mL, 61.2 mmol) and stirred for 48 hours in the dark and at room temperature. After concentrating the mixture in the rotary evaporator, the residue was dissolved in pyridine (9 mL), cooled on an ice-

water bath, and acetic anhydride (9 mL) was added and it was allowed to stir 24 hours at room temperature. Finally, the reaction mixture was concentrated to dryness and the residue was purified by column chromatography using a toluene-ethyl acetate mixture 10:1 as eluent, obtaining the compound 2,3,4,5-tetra-*O*-acetyl-1,6-dibromo-1,6-dideoxy-D-mannitol as a white solid (4.25 g, 32.5%) whose physical characteristics were identical to those described in the literature (Fidalgo *et al.*, 2013).

IR: ν_{\max} (cm⁻¹) 2100 (N=N⁺=N⁻), 1745 (CO).

¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ (ppm) 2.14 (s, 12H, CH₃), 3.31 (dd, 2H, *J* = 5.63 and 13.52 Hz, H-1_{a/b}, H-6_{a/b}), 3.51 (dd, 2H, *J* = 3.46 and 13.52 Hz, H-1_{a/b}, H-6_{a/b}), 5.04-5.09 (m, 2H, H-2, H-5), 5.45 (d, 2H, *J* = 8.39 Hz, H-3, H-4).

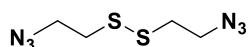
¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz): δ (ppm) 20.6, 20.7 (CH₃), 50.7 (C-1, C-6), 68.2 (C-3, C-4), 68.6 (C-2, C-5), 169.7, 169.8 (CO).

To a solution of the above synthesized compound (4.25 g, 8.9 mmol) in DMF (58.2 mL), sodium azide (2.32 g, 35.7 mmol) was added and the mixture was stirred at 80 °C for 2.5 hours. Afterwards, the solvent was removed under vacuum distillation and the obtained residue was redissolved in ethyl acetate and filtered over siliceous earth. The filtrate was concentrated to dryness and the product was purified by column chromatography using a TBME-hexane 1:2 mixture as eluent. The title compound was obtained as a colorless syrup (3.04 g, 85.1%) with physical characteristics identical to those described in the literature (Fidalgo *et al.*, 2013).

IR: ν_{\max} (cm⁻¹) 2100 (N₃), 1745 (CO).

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ (ppm) 2.14 (s, 12H, CH₃), 3.31 (dd, 2H, *J* = 5.63 and 13.52 Hz, H-1_{a/b}, H-6_{a/b}), 3.51 (dd, 2H, *J* = 3.46 and 13.52 Hz, H-1_{a/b}, H-6_{a/b}), 5.04-5.09 (m, 2H, H-2, H-5), 5.45 (d, 2H, *J* = 8.39 Hz, H-3, H-4).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ (ppm) 20.6, 20.7 (CH₃), 50.7 (C-1, C-6), 68.2 (C-3, C-4), 68.6 (C-2, C-5), 169.7, 169.8 (CO).

1,1'-Diazido-1,1'-dideoxy-2,2'-dithiodiethanol (DT)

To a solution of commercial 2,2'-dithiodiethanol (4.96 g, 3.17 mmol) and triethylamine (9.21 mL, 67.8 mmol) in THF (40 mL) under argon atmosphere at 0 °C, mesyl chloride (5.23 mL, 67.8 mmol) was added dropwise. After stirring one hour at 0 °C, the reaction mixture was treated with a saturated solution of ammonium chloride (50 mL) and was extracted twice with CH₂Cl₂ (50 mL). The combined organic extracts were dried with anhydrous sodium sulfate, filtered and the organic phase was concentrated to dryness to give the di-*O*-mesyl derivative as a liquid (10.1 g, 100%), which was used without further purification as follows:

To a solution of the di-*O*-mesyl derivative (10 g, 32.2 mmol) in anhydrous DMF (276 mL) was added sodium azide (8.36 g, 128.6 mmol) and the mixture was heated at 80 °C for 24 hours. After this time, the mixture was concentrated to dryness and the residue co-evaporated with toluene. The solid obtained was diluted with CH₂Cl₂ (250 mL) and washed with a saturated solution of sodium bicarbonate (250 mL) and then with water. The organic phase was dried with anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness. The residue obtained was purified by column chromatography using a mixture of AcOEt-hexane 1:6 as eluent to give DT as a yellowish liquid (4.7 g, 72%) whose physical characteristics were identical to those described in the literature (Wang *et al.*, 2011).

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ (ppm) 2.89 (t, 4H, *J* = 6.7 Hz, CH₂N), 3.62 (t, 4H, *J* = 6.7 Hz, CH₂S). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ (ppm) 37.6 (CH₂S), 49.9 (CH₂N).

4.5.2 Polytriazoles

4.5.2A General procedure for the synthesis of polytriazoles

All the PT here described were synthesised by 1,3-dipolar cycloaddition reaction of dialkyne and diazide derivatives catalyzed by copper salts (CuAAC) or thermally induced. The former controls regiochemistry giving rise to 1,4-disubstituted triazoles, while thermal conditions gave a mixture of 1,4- and 1,5-disubstituted triazoles along the polymer chains.

CuAAC method. An equimolecular ratio of the selected dialkynyl monomer (TA, DPL or DPN) and diazide monomer (IM, AIM, AM or DT) was added to a mixture of t BuOH- H_2O . The suspension formed was treated with a 20% of the initial molar ratio of $CuSO_4$ and 40% of sodium ascorbate, and the mixture was stirred at 50 °C for 24 hours. Then the supernatant was removed and the residue was dissolved in the minimum possible amount of DMSO. Finally, the obtained solution was added dropwise in cold diethyl ether and the solid formed was filtered and dried under vacuum to give the polymers as slightly coloured solids.

Thermal method. For the 1,3-dipolar cycloaddition in its classical thermal version, the selected diazido monomer (IM, AM or DT) was weighed in a small round bottom flask, and a solution of the dialkynyl monomer (TA, DPL or DPN) in dichloromethane was added. The solvent was removed under a stream of argon and reaction mixture was progressively heated from room temperature up to 55-60 °C for 20 h under an argon atmosphere. The resulting polymers were in general slightly coloured solids and they were dried under vacuum before characterization by GPC analysis, IR, 1H and ^{13}C NMR spectroscopy. Those polytriazoles being insoluble in the common deuterated solvents, were studied by High resolution–Magic Angle Spinning (HR-MAS NMR).

4.5.2B General procedure for the removal of the *N*-Boc protecting group of polytriazoles

The selected *N*-Boc protected PT were treated with 4N HCl solution in dry dioxane, under an argon atmosphere, at room temperature for 4 hours after what solid compounds were formed. They were filtered and washed with dry dioxane and diethyl ether. The corresponding polymers were dried under vacuum and they were characterized as the amine hydrochloride derivatives as solids.

4.5.2C General procedure for the removal of the *O*-isopropylidene group of polytriazoles

A solution of the selected polymer in THF was treated with a mixture of trifluoroacetic acid-water 6:1, at 40 °C for 24 hours. After this time, the obtained solution was added dropwise into cold diethyl ether, and the precipitated polymer was filtered, washed with diethyl ether, and dried under vacuum at 40 °C for 24 h to give polyhydroxytriazoles as solids.

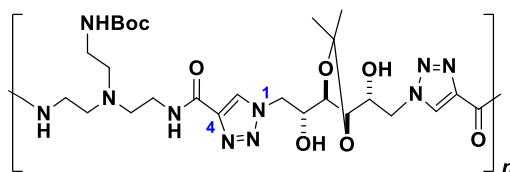
4.5.2D General procedure for *O*-deacetylation of polytriazoles

A solution of the acetylated PT in anhydrous methanol was treated with 1 M NaOMe solution to reach pH 9, under argon atmosphere, at room temperature for 24 hours. Then the precipitated polymer was filtered, washed with methanol and diethyl ether, and dried under vacuum at 40 °C for 24 h to give the polyhydroxytriazoles as solids.

4.5.2E Spectroscopic data of the new synthesized polytriazoles

4.5.2E1 Cationic poly(amido triazoles) and their precursors

PT[1,4(BocTA-IM)] (1)

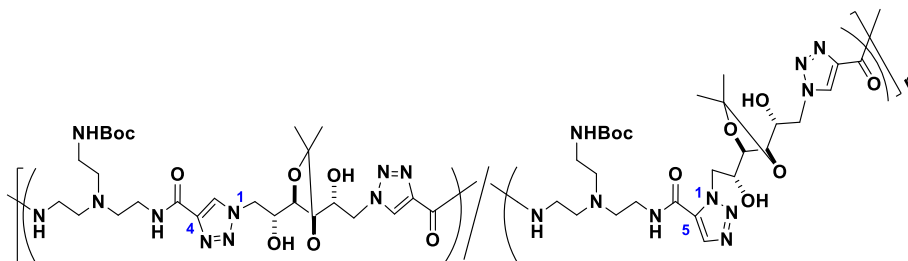


IR: ν_{\max} (cm^{-1}) 1649 (amide I), 1577 (amide II).

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz): δ (ppm) 1.34 [s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 1.38 [s, 6H, $\text{OC}(\text{CH}_3)_2$], 2.62-2.74 (m, 6H, NCH_2), 2.91-3.05 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{NH-Boc}$), 3.78-4.10 (m, 4H, H-2, H-3, H-4, H-5), 4.28-4.48 (m, 2H, H-1_a, H-6_a), 4.51-4.74 (m, 2H, H-1_b, H-6_b), 5.52-5.75 (m, 2H, OH), 6.64 (s, 1H, NH-Boc), 8.36 (s, 2H, NH), 8.40 (s, 2H, CH=C).

^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz): δ (ppm) 27.4 [$\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 28.2 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 36.7 ($\text{CH}_2\text{NH chain}$), 38.3 ($\text{CH}_2\text{NH-Boc}$), 52.9, 53.1, 53.4 (C-1, C-6, CH_2N), 70.5, 71.2 (C-2, C-5), 77.4 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 79.0, 79.7, 80.0 (C-3, C-4), 109.3, 109.5 [$\text{OC}(\text{CH}_3)_2$], 127.1 (CH=C), 142.5 (CH=C), 155.6 (CO-Boc), 159.7 (CO).

PT[1,4/1,5(BocTA-IM)] (2)

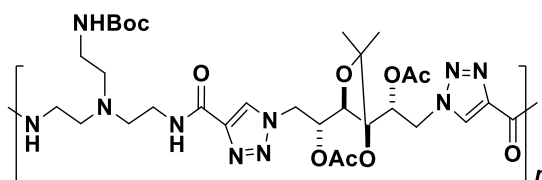


IR: ν_{\max} (cm^{-1}) 1647 (amide I), 1573 (amide II), 1250 (CH_3).

^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ (ppm) 1.28-1.41 (m, 30H, CH_3 , CH_3'), 2.52-2.76 (m, 12H, NCH_2 , NCH_2'), 2.88-3.06 (m, 4H, CH_2NHBoc , $\text{CH}_2'\text{NHBoc}$), 3.08-3.16 (m, 1.9H, $\text{CH}_2'\text{NH}$), 3.66-4.05 (various m, 8H, H-2, 2', H-3, 3', H-4, 4', H-5, 5'), 4.31-4.46 (m, 3H, H-1 $_a$, H-6 $_a$), 4.54-4.64 (m, 3H, H-1 $_b$, H-6 $_b$), 4.66-4.86 (m, 1.9H, H-1' $_{a/b}$, H-6' $_{a/b}$), 5.31-5.70 (various m, 4H, OH, OH'), 6.64 (s, 2H, NHBoc , $\text{NH}'\text{Boc}$), 8.14 (s, 0.9H, $\text{CH}'=\text{C}$), 8.34 (s, 3.1H, NH), 8.40 (s, 3.1H, $\text{CH}=\text{C}$), 8.62 (s, 0.9H, NH').

^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ (ppm) 27.3 [$\text{C}(\text{CH}_3)_2$, $\text{C}(\text{CH}_3)_2'$], 28.1 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $\text{C}(\text{CH}_3)_3'$], 36.7 (CH_2NH chain), 37.3 ($\text{CH}_2'\text{NH}$ chain), 38.3 (CH_2NHBoc , $\text{CH}_2'\text{NHBoc}$), 52.8, 53.2, 53.3 (C-1', C-6', $\text{CH}_2'\text{N}$), 52.9, 53.1, 53.2 (C-1, C-6, CH_2N), 70.3, 70.7 (C-2', C-5'), 70.4, 71.1 (C-2, C-5), 77.4 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $\text{C}(\text{CH}_3)_3'$], 79.0, 79.7, 80.0 (C-3, C-4), 79.1, 79.4, 80.4 (C-3', C-4'), 109.3, 109.5 [$\text{OC}(\text{CH}_3)_2$, $\text{OC}(\text{CH}_3)_2'$], 127.0 ($\text{CH}=\text{C}$), 131.4 ($\text{CH}=\text{C}'$), 133.6 ($\text{CH}'=\text{C}$), 142.5 ($\text{CH}=\text{C}$), 155.6 (COBoc), 157.7 (CO'), 159.6 (CO).

PT[1,4(BocTA-AIM)] (3)

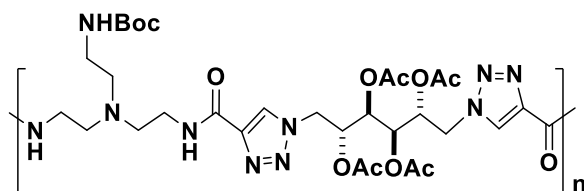


IR: ν_{max} (cm^{-1}) 1652 (amide I), 1572 (amide II).

^1H RMN (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ (ppm) 1.36 [s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 1.44 [s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 1.93, 2.07 (s, 6H, COCH_3), 2.51-2.55 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 2.62-2.75 (m, 4H, NCH_2), 2.95-3.07 (m, 2H, CH_2NHBoc), 3.22-3.46 (m, 4H, CH_2NH), 4.18-4.27 (m, 2H, H-3, H-4), 4.62-4.74 (m, 2H, H-1 $_a$, H-6 $_a$), 4.79-4.89 (m, 2H, H-1 $_b$, H-6 $_b$), 5.25-5.34 (m, 2H, H-2, H-5), 6.66 (s, 1H, NHBoc), 8.39 (s, 2H, NH), 8.56 (s, 2H, $\text{CH}=\text{C}$).

^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ (ppm) 20.3 (COCH_3), 26.8 [$\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 28.2 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 36.8 (CH_2NH), 38.3 (CH_2NHBoc), 49.6 (C-1, C-6), 53.1 (CH_2N), 71.5 (C-2, C-5), 76.9 (C-3, C-4), 77.5 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 110.9 [$\text{OC}(\text{CH}_3)_2$], 127.2 ($\text{CH}=\text{C}$), 142.8 ($\text{CH}=\text{C}$), 155.5 (COBoc), 159.4 (CO), 169.2 (COCH_3).

PT[1,4(BocTA-AM)] (4)

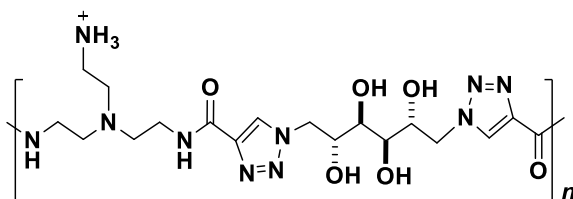


IR: ν_{max} (cm^{-1}) 1653 (amide I), 1572 (amide II).

^1H RMN (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ (ppm) 1.36 [s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 1.90, 2.11 (2s, 12H, COCH_3), 2.54-2.59 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 2.61-2.75 (m, 4H, NCH_2), 2.94-3.06 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 3.23-3.41 (m, 4H, NHCH_2), 4.55-4.82 (m, 4H, H-1 $_{a/b}$, H-6 $_{a/b}$), 5.19-5.38 (m, 4H, H-2, H-3, H-4, H-5), 6.66 (s, 1H, NHBoc), 8.39 (s, 2H, NH), 8.52 (s, 2H, $\text{CH}=\text{C}$).

^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ (ppm) 20.2, 20.5 (COCH_3), 28.2 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 36.7 (CH_2NH), 38.2 (CH_2NHBoc), 49.7 (C-1, C-2), 53.1 (CH_2N), 53.4 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 68.1 (C-3, C-4), 68.5 (C-2, C-5), 77.4 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 127.1 ($\text{CH}=\text{C}$), 142.8 ($\text{CH}=\text{C}$), 155.6 (COBoc), 159.4 (CO), 168.8, 169.7 (COCH_3).

PT[1,4(TA-M)] (5)

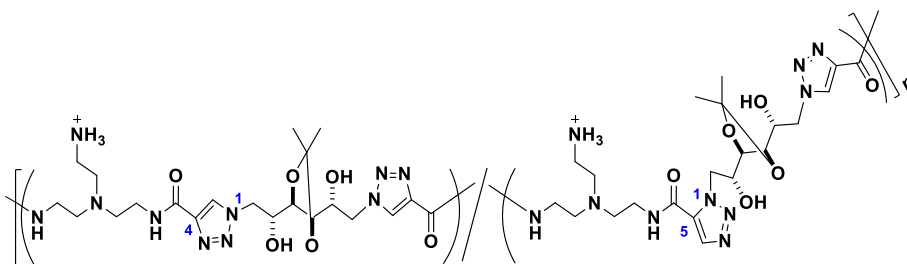


IR: ν_{\max} (cm^{-1}) 1643 (amide I), 1575 (amide II).

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz): δ (ppm) 3.25-3.35 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 3.38-3.47 (m, 4H, CH_2NH), 3.48-3.57 (m, 4H, CH_2NH_2 , H-3, H-4), 3.57-3.83 (m, 8H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, OH), 3.83-3.92 (m, 2H, H-2, H-5), 4.31-4.45 (m, 2H, H-1_a, H-6_a), 4.69-4.82 (m, 2H, H-1_b, H-6_b), 8.39 (bs, 2H, NH), 8.44 (s, 2H, $\text{CH}=\text{C}$), 8.79 (bs, NH_3^+).

^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz): δ (ppm) 33.3 (CH_2NH), 33.4 (CH_2NH_2), 49.6 (CH_2NH_2), 51.8 (CH_2NH), 53.9 (C-1, C-6), 69.2 (C-2, C-5), 70.2 (C-3, C-4), 127.4 ($\text{CH}=\text{C}$), 141.7 ($\text{CH}=\text{C}$), 160.2, 160.3 (CO).

PT[1,4/1,5(TA-M)] (6)



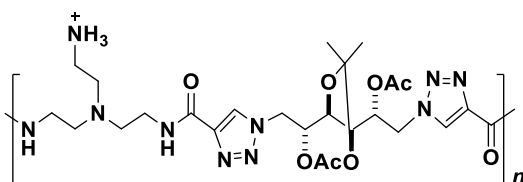
IR: ν_{\max} (cm^{-1}) 1647 (amide I), 1572 (amide II).

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz): δ (ppm) 1.38 (m, 6.8 H, CH_3 and CH_3'), 3.22-3.49 (m, 12H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, $\text{NCH}_2\text{CH}_2'\text{NH}$, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $\text{NCH}_2'\text{CH}_2\text{NH}_2$), 3.49-3.63 (m, 4H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $\text{NCH}_2\text{CH}_2'\text{NH}_2$), 3.63-3.79 (m, 8H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, $\text{NCH}_2'\text{CH}_2\text{NH}$), 3.79-4.96 (m, 20H, H-1_{a/b}, 1'_{a/b}, H-2, 2', H-3, 3', H-4, 4', H-5, 5', H-6_{a/b}, 6'_{a/b}, OH, OH'), 8.29 ($\text{CH}'=\text{C}$), 8.37 (NH'), 8.44, (bs, NH), 8.52 (s, $\text{CH}=\text{C}$), 8.81 (bs, NH_3^+).

^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz): δ (ppm) 27.4 (CH_3 , CH_3'), 33.2 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 33.3 ($\text{NCH}_2'\text{CH}_2\text{NH}_2$), 49.5 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2'\text{NH}_2$), 51.7 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 52.8, 53.8, 53.4, 54.3 (C-1, 1', C-6, 6'), 69.2, 69.7, 70.4 (C-2, C-5), 69.6, 70.1 (C-2', C-5'), 79.7 (C-

3, C-4), 80.1 (C-3',C-4'), 109.6 [$C(CH_3)$, $C(CH_3)'$], 127.5 (CH=C), 130.1 (CH=C'), 134.3 (CH'=C), 141.9 (CH=C), 159.6 (CO'), 160.4 (CO).

PT[1,4(TA-AIM)] (7)

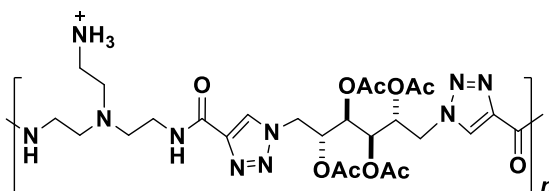


IR: ν_{\max} (cm^{-1}) 3220 (OH), 1649 (amide I), 1577 (amide II), 1234 (CH_3 i Pr).

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz): δ (ppm) 1.43 [s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 1.94 (s, 6H, COCH_3), 3.26-3.37 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 3.37-3.48 (m, 4H, CH_2N), 3.50-3.62 (m, 2H, CH_2NH_2), 3.63-3.77 (m, 4H, CH_2NH), 4.14-4.30 (m, 2H, H-3, H-4), 4.59-4.95 (m, 4H, H-1 $_{a/b}$, H-6 $_{a/b}$), 5.20-5.34 (m, 2H, H-2, H-5), 8.49 (bs, 2H, NH), 8.67 (s, 2H, CH=C), 8.84 (bs, NH_3^+).

^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz): δ (ppm) 20.4 (COCH_3), 26.8 [$\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 33.3 (CH_2NH), 33.4 (CH_2NH_2), 49.5 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 49.6 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 51.6 (C-1, C-6), 71.5, 71.9 (C-2, C-5), 76.3, 76.8 (C-3, C-4), 110.9 [$\text{OC}(\text{CH}_3)_2$], 127.6 (CH=C), 142.2 (CH=C), 160.0 (CO), 169.2 (COCH_3).

PT[1,4(TA-AM)] (8)



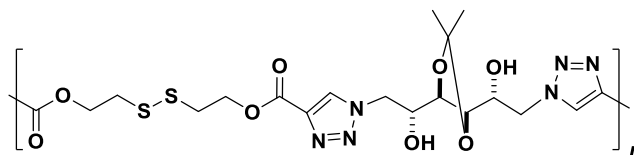
IR: ν_{\max} (cm^{-1}) 1650 (amide I), 1574 (amide II).

^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ (ppm) 1.89, 2.11 (2s, 12H, COCH_3), 3.22-3.48 (m, 6H, NCH_2), 3.49-3.76 (m, 6H, CH_2NH , CH_2NH_2), 4.52-4.84 (m, 4H, H-1_{a/b}, H-6_{a/b}), 5.13-5.38 (m, 4H, H-2, H-3, H-4, H-5), 8.51 (bs, 2H, NH), 8.62 (s, 2H, $\text{CH}=\text{C}$), 8.82 (bs, NH_3^+).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ (ppm) 20.3, 20.6 (COCH_3), 33.2 (CH_2NH and CH_2NH_2), 49.5 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 49.7 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 51.5 (C-1, C-6), 68.0 (C-2, C-5), 68.5 (C-3, C-4), 127.4 ($\text{CH}=\text{C}$), 142.2 ($\text{CH}=\text{C}$), 159.9 (CO), 168.8, 169.7 (COCH_3).

4.5.2E2 DPL-based poly(ester triazoles)

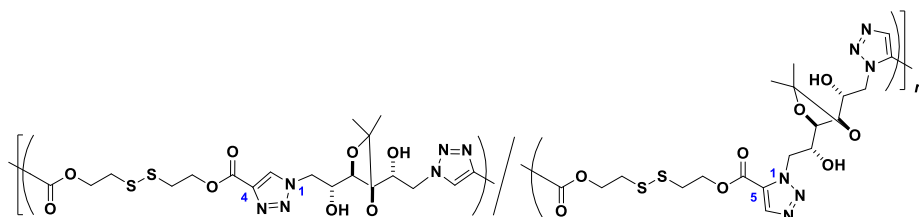
PT[1,4(DPL-IM)] (9)



IR: ν_{max} 1700 cm^{-1} (CO).

^1H RMN (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm) 1.40 (s, 6H, CH_3), 3.07-3.21 (m, 4H, CH_2S), 3.93-4.05 (m, 4H, H-1_{a/b}, H-6_{a/b}), 4.37-4.48 (m, 2H, H-2, H-5), 4.49-4.58 (m, 4H, CH_2O), 4.59-4.68 (m, 2H, H-3, H-4), 5.64 (bs, 2H, OH), 8.66 (s, 2H, $\text{CH}=\text{C}$).

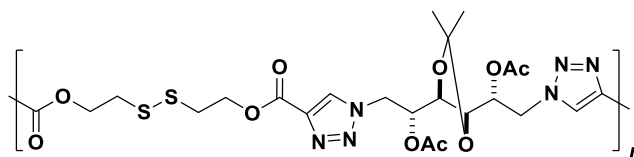
^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm) 27.4 (CH_3), 36.4 (CH_2S), 53.0 (C-1, C-6), 62.2 (CH_2O), 70.3 (C-2, C-5), 79.7 (C-3, C-4), 109.7 [$\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 130.2 ($\text{CH}=\text{C}$), 138.1 ($\text{CH}=\text{C}$), 160.1 (CO).

PT[1,4/1,5(DPL-IM)] (10)

IR: ν_{\max} 1713 cm^{-1} (CO).

^1H RMN (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm) 1.40 (bs, 12H, CH_3 , CH_3'), 2.91-3.21 (m, 8H, CH_2S , $\text{CH}_2'\text{S}$), 3.65-3.72 (m, 0.5H, H-1', H-6'), 3.94-4.09 (m, 7.5H, H-1, H-6), 4.36-4.48 (m, 4H, H-2, 2', H-5, 5'), 4.46-4.61 (m, 8H, CH_2O , $\text{CH}_2'\text{O}$), 4.61-4.89 (m, 4H, H-3, 3', H-4, 4'), 5.48 (bs, 0.5H OH'), 5.63 (bs, 3.5H, OH), 8.26 (bs, 0.5H, $\text{CH}'=\text{C}$), 8.67 (s, 3.5H, $\text{CH}=\text{C}$).

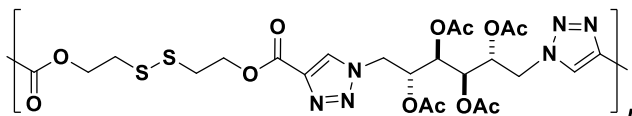
^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm) 27.2 (CH_3'), 27.4 (CH_3), 35.9 (SCH_2'), 36.4 (SCH_2), 53.0, 53.8, 53.9, (C-1, 1', C-6, 6'), 62.2, 63.1, 63.6 (CH_2O , $\text{CH}_2'\text{O}$), 70.3, (C-2, C-5), 74.6 (C-2', C-5'), 79.5, 79.8, 80.0 (C-3, 3', C-4, 4'), 109.6 [$\text{C}(\text{CH}_3)_2'$], 109.7 [$\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 129.9 ($\text{CH}'=\text{C}$), 130.2 ($\text{CH}=\text{C}$), 138.1 ($\text{CH}=\text{C}$), 152.0 ($\text{CH}=\text{C}$), 158.0 (CO'), 160.1 (CO).

PT[1,4(DPL-AIM)] (11)

IR: ν_{\max} 1733 cm^{-1} (CO).

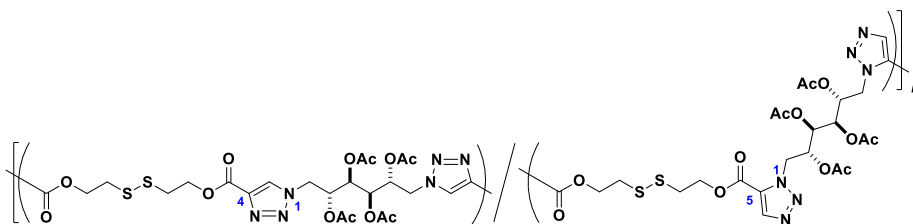
^1H RMN (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ (ppm) 1.42 [s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 1.92 (s, 6H, COCH_3), 3.02-3.20 (m, 4H, CH_2S), 4.16-4.26 (m, 2H, H-3, H-4), 4.40-4.60 (m, 4H, CH_2O), 4.61-4.95 (m, 4H, H-1_{a/b}, H-6_{a/b}), 5.20-5.29 (m, 2H, H-2, H-5), 8.82 (s, 2H, $\text{CH}=\text{C}$).

PT[1,4(DPL-AM)] (12)



¹³C RMN (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ (ppm) 20.2, 20.5 (CH₃), 36.3 (CH₂S), 49.9 (C-1, C-6), 62.8 (CH₂O), 68.1 (C-2, C-5), 68.5 (C-3, C-4), 130.1 (CH=C), 138.4 (CH=C), 159.9 (CO chain), 168.9, 169.7 (COCH₃).

PT[1,4/1,5(DPL-AM)] (13)

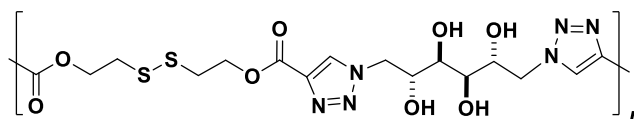


¹H RMN (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ (ppm) 1.77-1.93 (m, 12H, CH₃, CH'₃), 1.99-2.15 (m, 12H, CH₃, CH'₃), 2.96-3.01 (m, 0.5H, CH'₂S), 3.06-3.19 (m, 7.5H, CH₂S), 4.35-

5.04 (m, 16H, H-1_{a/b}, 1' _{a/b}, H-6 _{a/b}, 6' _{a/b}, CH₂O, CH₂O'), 5.15-5.46 (m, 8H, H-2, 2', H-3, 3', H-4, 4', H-5, 5'), 8.25 (s, 0.5H, CH'=C), 8.78 (s, 3.5H, CH=C).

¹³C RMN (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ (ppm) 20.0, 20.2, 20.5 (CH₃, C'H₃), 35.9 (CH₂S'), 36.3 (CH₂S), 49.8 (C-1, C-6), 50.1 (C-1', C-6'), 62.3 (CH₂O), 63.3, 63.5 (CH₂O'), 67.4, 68.0 (C-2', C-5'), 67.9 (C-2, C-5), 68.1, 68.2 (C-3', C-4'), 68.4 (C-3, C-4), 128.1 (CH'=C), 130.1 (CH=C), 137.6 (CH=C'), 138.4 (CH=C), 157.7 (CO'), 159.8 (CO chain), 168.8, 168.9, 169.2, 169.4, 169.7 (COCH₃, CO'CH₃).

PT[1,4(DPL-M)] (14)

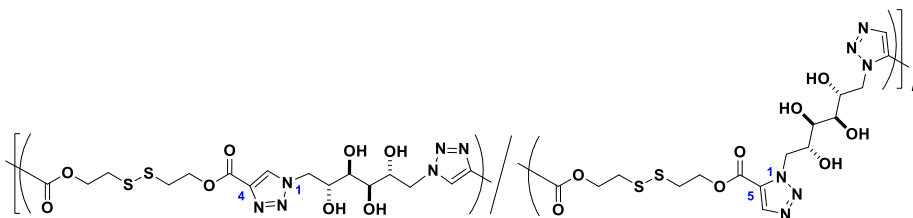


IR: ν_{\max} 1717 cm⁻¹ (CO).

¹H RMN (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ (ppm) 2.96-3.14 (m, 4H, CH₂S), 3.35-3.49 (m, 1.6H, OHCH-3, OHCH-4), 3.72-3.94 (m, 2.4H, H-2, H-5, OCH-3, OCH-4), 3.98-4.86 (m, 10H, H-1_{a/b}, H-6_{a/b}, CH₂O, OH), 8.50 (s, 2H, CH=C).

¹³C RMN (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ (ppm) 35.7 (CH₂S), 53.2 (C-1, C-6), 61.4 (CH₂O), 68.4 (C-2, C-5), 69.4 (C-3, C-4), 78.7 (OC-3, OC-4), 124.4 (CH=C), 137.8 (CH=C), 159.5 (CO).

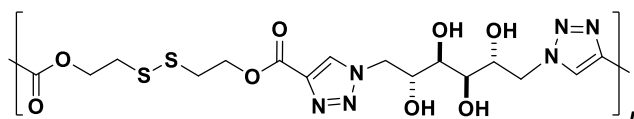
PT[1,4/1,5(DPL-M)] (15)



IR: ν_{\max} 1717 cm⁻¹ (CO).

¹³C RMN (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ (ppm) 35.9 (SCH₂'CH₂O), 36.3 (SCH₂'CH₂O), 53.0 (C-1', C-6'), 53.9 (C-1, C-6), 62.1 (CH₂O), 63.6 (CH₂O'), 69.2 (C-2, 2', C-5, 5'), 70.2 (OHC-3, 3', OHC-4, 4'), 70.4 (OC-3, 3', OC-4, 4'), 130.0 (CH=C), 130.1 (CH'=C), 137.9 (CH=C), 138.7 (CH=C'), 160.1 (CO'), 160.2 (CO).

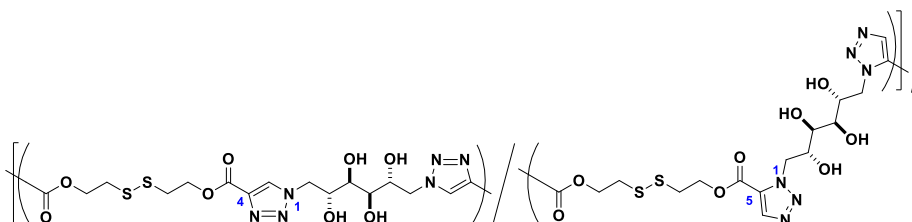
PT[1,4(DPL-M)] (16)



IR: ν_{max} 1713 cm^{-1} (CO).

¹H RMN (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ (ppm) 3.09-3.21 (m, CH₂S), 3.48-3.55 (t, *J*= 8.46Hz, H-3, H-4), 3.85-3.94 (m, H-2, H-5), 4.35-4.44 (m, H-1_a, H-6_a), 4.50-4.58 (m, CH₂O), 4.69-4.82 (m, H-1_b, H-6_b), 5.13-5.21 (d, *J*= 6.63Hz, OH), 8.58 (s, CH=C).

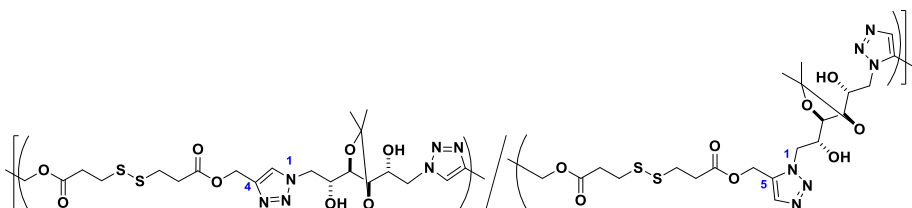
¹³C RMN (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ (ppm) 36.4 (CH₂S), 53.7 (C-1, C-6), 62.2 (CH₂O), 69.2 (C-2, C-5), 70.2 (C-3, C-4), 130.1 (CH=C), 138.0 (CH=C), 160.2 (CO).

PT[1,4/1,5(DPL-M)] (17)

IR: ν_{\max} 3295 (OH), 1722 cm^{-1} (CO).

^1H RMN (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ (ppm) 3.09-3.21 (m, CH_2S , $\text{CH}_2\text{S}'$), 3.48-3.55 (t, $J = 8.46\text{Hz}$, H-3, 3', H-4, 4'), 3.85-3.94 (m, H-2, 2', H-5, 5'), 4.35-4.44 (m, H-1 $_a$, 1 $_a'$, H-6 $_a$, 6 $_a'$), 4.50-4.58 (m, $\text{CH}_2\text{O}'$, CH_2O), 4.69-4.82 (m, H-1 $_b$, 1 $_b'$, H-6 $_b$, 6 $_b'$), 5.13-5.21 (d, $J = 6.63\text{Hz}$, OH, OH'), 8.58 (s, $\text{CH}'=\text{C}$, $\text{CH}=\text{C}$).

^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ (ppm) 36.4 (CH_2S , $\text{CH}_2\text{S}'$), 53.7 (C-1, 1', C-6, 6'), 62.2 (CH_2O , $\text{CH}_2\text{O}'$), 69.2 (C-2, 2', C-5, 5'), 70.2 (C-3, 3', C-4, 4'), 130.1 ($\text{CH}=\text{C}$, $\text{CH}'=\text{C}$), 138.0 ($\text{CH}=\text{C}$, $\text{CH}=\text{C}'$), 160.2 (CO, CO').

4.5.2E3 DPN-based poly(ester triazoles)**PT[1,4/1,5(DPN-IM)] (18)**

IR: ν_{\max} 1734 cm^{-1} (CO), 1209 (CH_3 $i\text{Pr}$).

^1H RMN (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ (ppm) 1.39 (s, 12H, CH_3 , CH_3'), 2.69-2.82 (m, 8H, CH_2CO , $\text{CH}_2\text{CO}'$), 2.87-2.96 (m, 8H, SCH_2 , SCH_2'), 3.89-4.05 (m, 8H, H-2, 2', H-3, 3', H-4, 4', H-5, 5'), 4.20-4.53 (m, 8H, H-1 $_a/b$, H-1 $_a'/b'$, H-6 $_a/b$, H-6 $_a'/b'$), 5.16

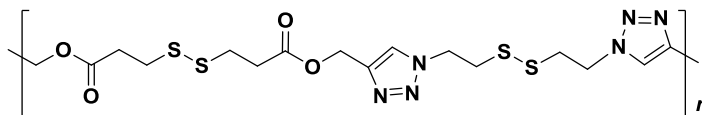
¹³C RMN (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ (ppm) 27.4 (CH₃, CH₃'), 32.4 (CH₂CO'), 32.6 (CH₂CO), 33.2 (SCH₂'), 33.4 (SCH₂), 51.1 (C-1', C-6'), 52.8 (C-1, C-6), 54.7 (CH₂O'), 57.5 (CH₂O), 70.7 (C-2, C-5), 71.3 (C-2', C-5'), 79.8 (C-3, C-4), 80.0 (C-3', C-4'), 109.7 [C(CH₃)₂, C(CH₃)₂'], 125.8 (CH=C), 133.5 (CH=C'), 133.8 (CH'=C), 141.4 (CH=C), 170.9 (CO'), 171.0 (CO).

¹H RMN (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ (ppm) 2.64-2.80 (m, 8H, SCH₂, SCH₂'), 2.84-2.96 (m, 4H, CH₂CO, CH₂CO'), 3.17-3.29 (m, 8H, H-1_{a/b}, 1'_{a/b}, H-6_{a/b}, 6'_{a/b}), 4.58-4.77 (m, 8H, H-2, 2', H-3, 3', H-4, 4', H-5, 5'), 5.15 (m, 5.2H, CH₂O), 5.28 (m, 2.8H, CH₂O'), 7.77 (s, 1.4H, CH'=C), 8.08 (s, 2.6H, CH=C).

¹³C RMN (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ (ppm) 32.3 (CH₂CO'), 32.5 (CH₂CO), 33.2 (SCH₂'), 33.2 (SCH₂), 36.8 (C-1', C-6'), 36.9 (C-1, C-6), 46.5 (C-2, 2', C-3, 3', C-4, 4', C-5, 5'), 48.1 (C-2, C-3, C-4, C-5), 53.9 (CH₂O'), 57.4 (CH₂O), 124.9 (CH=C), 132.3 (CH=C'), 134.2 (CH'=C), 141.7 (CH=C), 170.7 (CO'), 170.9 (CO).

4.5.2E4 DT-based poly(ester triazoles)

PT[1,4(DPN-DT)] (19)

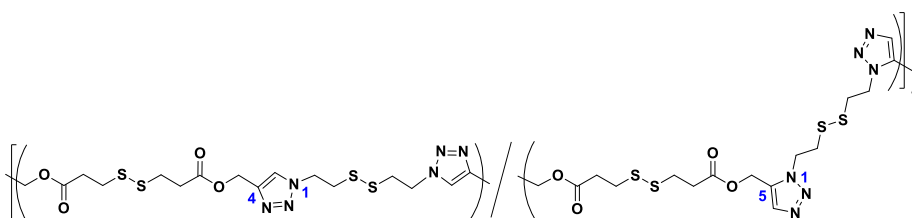


IR: ν_{\max} 1725 cm^{-1} (CO).

^1H RMN (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ (ppm) 2.68-2.76 (m, 4H, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 2.85-2.95 (m, 4H, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 3.17-3.27 (m, 4H, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 4.53-4.67 (t, 4H, $J=6.30$ Hz, CH_2N), 5.08-5.21 (bs, 4H, CH_2O), 8.18 (s, 2H, $\text{CH}=\text{C}$).

^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ (ppm) 32.5 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 33.3 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 36.7 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 48.1 (CH_2N), 57.4 (CH_2O), 124.9 ($\text{CH}=\text{C}$), 142.1 ($\text{CH}=\text{C}$), 171.1 (CO).

PT[1,4/1,5(DPN-DT)] (20)



IR: ν_{\max} 1728 cm^{-1} (CO).

^1H RMN (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ (ppm) 2.62-2.80 (m, 8H, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$, $\text{SCH}_2'\text{CH}_2\text{CO}$), 2.81-2.97 (m, 8H, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$, $\text{SCH}_2\text{CH}_2'\text{CO}$), 3.12-3.30 (m, 8H, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{N}$, $\text{SCH}_2'\text{CH}_2\text{N}$), 4.49-4.75 (m, 8H, CH_2N , $\text{CH}_2'\text{N}$), 5.14 (bs, 4.7H, CH_2O), 5.27 (bs, 3.3H, $\text{CH}_2\text{O}'$), 7.76 (s, 1.6H, $\text{CH}'=\text{C}$), 8.17 (s, 2.4H, $\text{CH}=\text{C}$).

^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ (ppm) 32.3 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2'\text{CO}$), 32.6 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 33.2 ($\text{SCH}_2'\text{CH}_2\text{CO}$), 33.3 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 36.9 ($\text{SCH}_2'\text{CH}_2\text{N}$), 37.0 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{N}$),

46.6 ($\text{CH}_2\text{N}'$), 48.1 (CH_2N), 54.0 ($\text{CH}_2\text{O}'$), 57.5 (CH_2O), 124.8 ($\text{CH}=\text{C}$), 132.1 ($\text{CH}=\text{C}'$), 134.1 ($\text{CH}'=\text{C}$), 141.5 ($\text{CH}=\text{C}$), 170.5 (CO'), 170.8 (CO).

CAPÍTULO

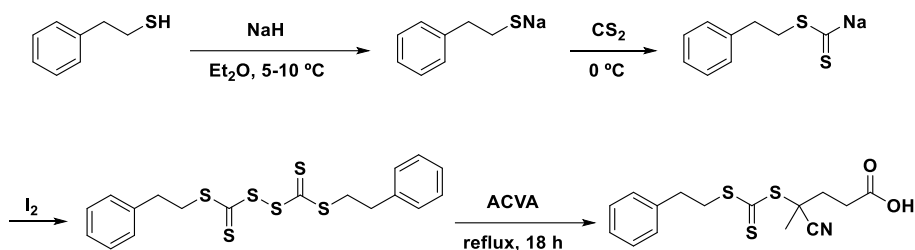
5

RAFT mediated PISA of hydroxylated block copolymer nanoparticles

5.1 Synthesis of the RAFT Agents

5.1.1 Synthesis of PETTC RAFT Agent

The 4-cyano-4-(2-phenylethanesulfanyl-thiocarbonyl)sulfanyl-pentanoic acid (PETTC) RAFT agent was synthesised in 80% yield, following the reaction scheme shown in Scheme 5.1 according to previous protocols (Rymaruk *et al.*, 2016). The first step of this synthesis is deprotonation of the thiol group present in 2-phenylethanethiol by sodium hydride to yield the sodium salt. This anionic species is then reacted with carbon disulfide to form a carbodithioate salt, which is oxidised using iodine to form the bis(thioacyl) disulfide. This intermediate is then refluxed with the radical initiator [4,4'-azobis(4-cyanovaleric acid)] (ACVA), and crude PETTC is prepared *via* radical-induced decomposition (Keddie *et al.*, 2012). Crude PETTC was recrystallised from a mixture of ethyl acetate and hexane (4:1 v/v) to yield PETTC as a yellow powder. The chemical structure of this RAFT Agent was confirmed by ^1H NMR analysis (Figure 5.1).



Scheme 5.1. Synthesis route of the RAFT agent PETTC (Rymaruk *et al.*, 2016).

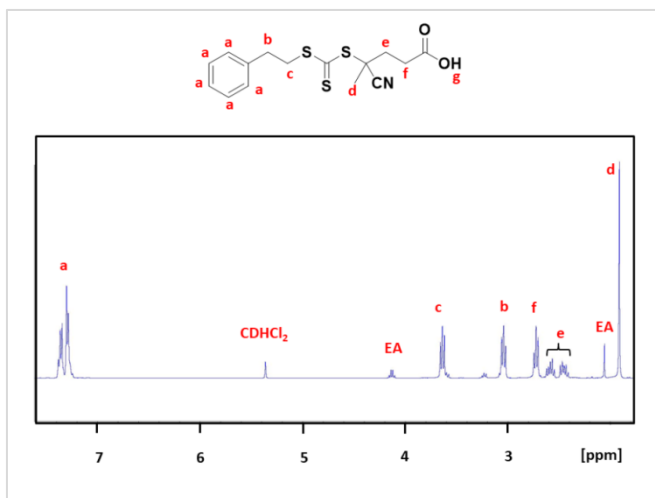
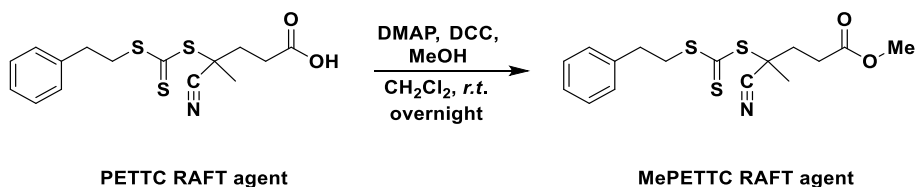


Figure 5.1. Full-assigned ^1H NMR spectra recorded in CD_2Cl_2 and at 298 K for PETTC RAFT agent. EA = ethyl acetate.

5.1.2 Synthesis of MePETTC RAFT Agent

PETTC RAFT agent was methylated using a previous protocol to prepared MePETTC (Penfold *et al.*, 2016a). This RAFT agent was obtained in 89% yield, following the reaction detailed in Scheme 5.2. ^1H NMR spectroscopy confirmed full methylation by the appearance of the singlet at 3.75 ppm (Figure 5.2). Obtained mass spectrometry and elemental analysis data were in very strong agreement with the theoretical values, confirming full methylation.



Scheme 5.2. Methylation of the PETTC RAFT agent to yield MePETTC (Penfold *et al.*, 2016a).

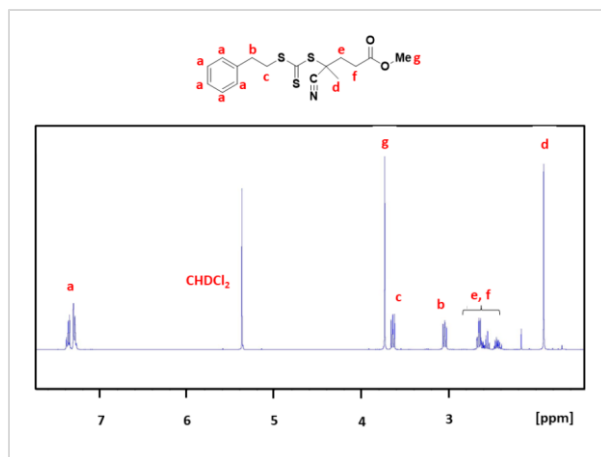
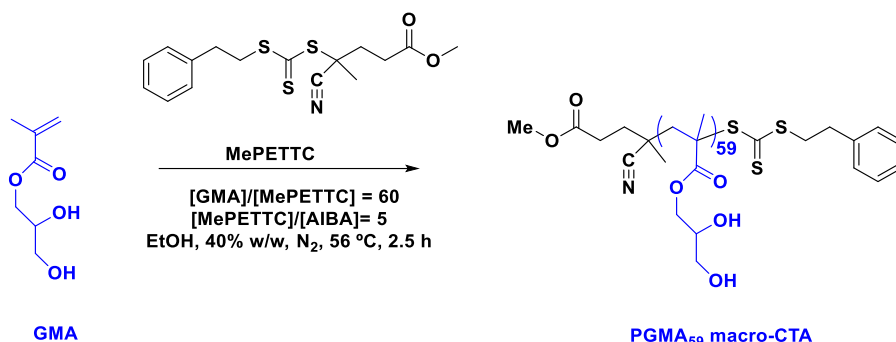


Figure 5.2. Full-assigned ^1H NMR spectra recorded in CD_2Cl_2 and at 298 K for MePETTC RAFT agent.

5.2 Synthesis of Macromolecular-Chain Transfer Agents

5.2.1 Synthesis of poly(glycerol monomethacrylate) macro-CTA by RAFT Solution Polymerisation

A well-defined and water-soluble poly(glycerol monomethacrylate) (PGMA) macromolecular chain transfer agent (macro-CTA) with a mean DP of 59 was prepared by RAFT polymerisation using Me-PETTC as the RAFT agent (see Scheme 5.3).



Scheme 5.3. Reaction scheme for the RAFT alcoholic solution polymerisation of GMA using MePETTC at 56 °C and 40% w/w in order to prepare a PGMA₅₉ macro-CTA (Penfold *et al.*, 2017b). AIBA = 2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride.

The RAFT solution polymerisation of GMA in ethanol with MePETTC at 56 °C was studied by ¹H NMR and DMFGPC to assess the kinetics of monomer conversion and the evolution of molecular weight. A mean DP of 60 was targeted at 40% w/w solids using a [MePETTC] / [AIBA] molar ratio of 5.0. Monomer conversions were calculated by comparing the integrated MePETTC aromatic end-group signals at 7.2-7.4 ppm to that of the vinyl monomer signals at 5.6 and 6.1 ppm. M_w and M_n values were determined by DMF GPC calibrated with a series of ten near-monodisperse poly(methyl methacrylate) standards (see Figure 5.3).

¹H NMR analysis indicated a GMA conversion of 70% within 2 h, with essentially full conversion being achieved after 3h. The linear semi-logarithmic plot against time indicated first-order kinetics with respect to monomer concentration [Figure 5.3 (a)]. Similarly, the linear evolution in polymer molecular weight, M_n , with monomer conversion, confirmed the expected pseudo-living character of this RAFT solution polymerisation [Figure 5.3 (b)].

The RAFT agent efficiency was estimated to be 75%, which is comparable to previously reported data (Ratcliffe *et al.*, 2013). Having established the kinetics for GMA homopolymerisation, a large batch of PGMA₅₉ macro-CTA was prepared. Firstly, a PGMA macro-CTA was synthesised using the non-ionic RAFT agent MePETTC (Penfold *et al.*, 2017b) *via* RAFT alcoholic solution polymerisation (Scheme 5.3). ¹H NMR spectroscopy studies indicated a mean DP of 59 for the purified PGMA macro-CTA, by comparing the integral values of the proton signals of the aromatic end-group at 7.2 – 7.4 ppm to the polymer backbone at 0 – 2.5 ppm (Figure 5.3). The mean DP was calculated to be 59 as judged by ¹H NMR spectroscopy by comparison of the integration signal corresponding to the pendent protons at 3.4 – 4.4 ppm to that assigned to the aromatic RAFT chain end at 7.4 – 8.0 ppm (see Figure 5.4). DMF GPC studies indicated an M_n of 15.6 kg mol⁻¹ and an M_w/M_n of 1.15 against a series of ten near monodisperse poly(methyl methacrylate) calibration standards.

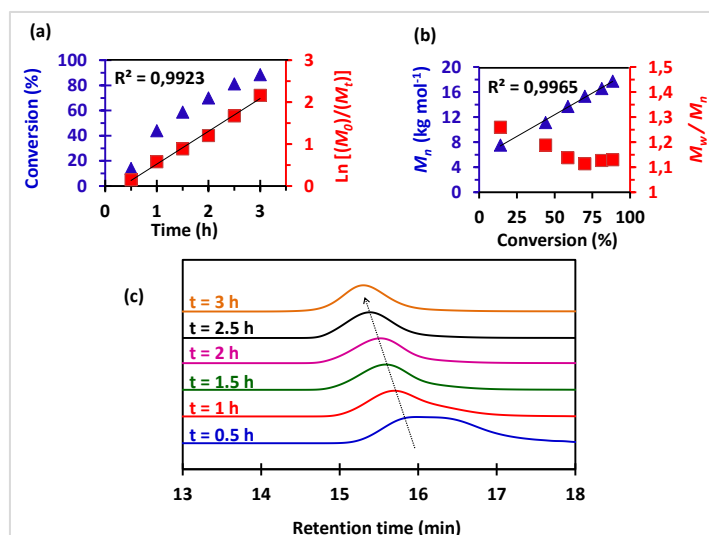


Figure 5.3. (a) Monomer conversion vs. time; (b) number-average molecular weight (M_n) and polydispersity (M_w/M_n) vs. conversion plots as determined by ¹H NMR and DMF GPC analyses, respectively, for the RAFT solution polymerisation of glycerol monomethacrylate (GMA) in ethanol at 56 °C. Conditions: 40% w/w; target DP = 60; [MePETTC] / [AIBA] molar ratio = 5.0; (c) DMF GPC traces obtained for the samples during the kinetic study at 30, 60, 90, 120, 150, 180 minutes.

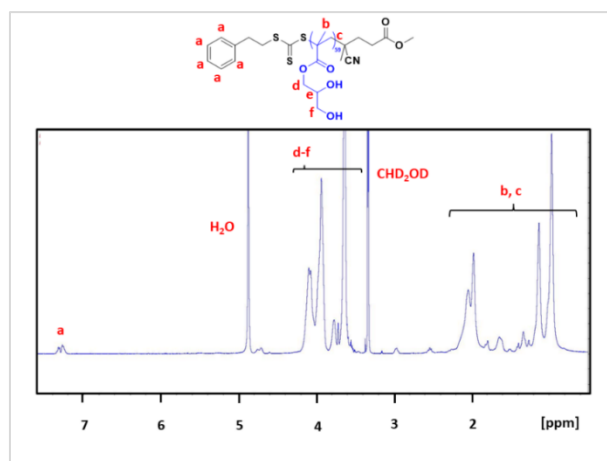
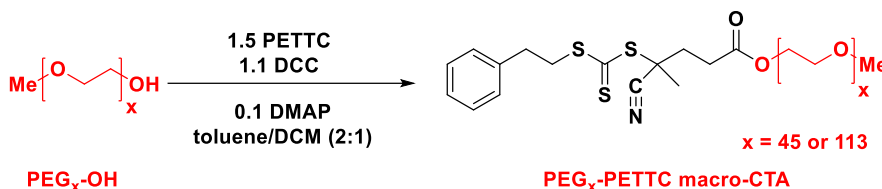


Figure 5.4. ¹H NMR spectrum recorded in CD₃OD and at 298K for MePETTC-PGMA₅₉ macro-CTA indicating a mean DP of 59 by comparison of the integral values of the aromatic end-group (a) to that of the polymer backbone (b, c).

5.2.2 Synthesis of Poly(ethylene glycol) Macro-Chain Transfer Agents

Poly(ethylene glycol monomethyl ether) ($M_n = 2000$, $DP = 45$ and $M_n = 5000$, $DP = 113$) macro-CTAs were synthesised by Steglich esterification using the carboxylic acid-functionalised PETTC RAFT (Scheme 5.4).



Scheme 5.4. Reaction scheme for the synthesis of PEG₄₅ and PEG₁₁₃ macro-CTAs by the esterification of monomethoxy PEG with the carboxylic acid functionalised RAFT agent PETTC.

The PEG₄₅ and the PEG₁₁₃ macro-CTAs were synthesised with yields of 67% and 94%, respectively. The degree of esterification for each macro-CTA was determined by ¹H NMR spectroscopy (see Figures 5.5 and 5.6). The mean degrees of esterification were calculated to be 95% in both cases by comparison of the integration values of the signals associated with the PEG backbone at 3.4 – 4.4 ppm to the aromatic signal associated with the RAFT agent end-group at 7.2 – 7.4 ppm. In addition, UV-GPC studies tuned to the absorbance wavelength of the RAFT agent (298 nm) showed little-to-no evidence for residual PETTC RAFT agent impurity. The PEG₄₅ and PEG₁₁₃ macro-CTAs synthesised exhibit M_n values of 4.4 kg mol⁻¹ and 8.7 kg mol⁻¹ as determined by DMF GPC against PMMA standards, respectively (see Figure 5.7). Furthermore, low M_w/M_n values of 1.05 and 1.09 were obtained for the PEG₄₅ and PEG₁₁₃ macro-CTAs, respectively. In addition, UV-GPC studies tuned

to the absorbance wavelength of the RAFT agent (298 nm) showed little-to-no evidence for residual PETTC RAFT agent impurity.

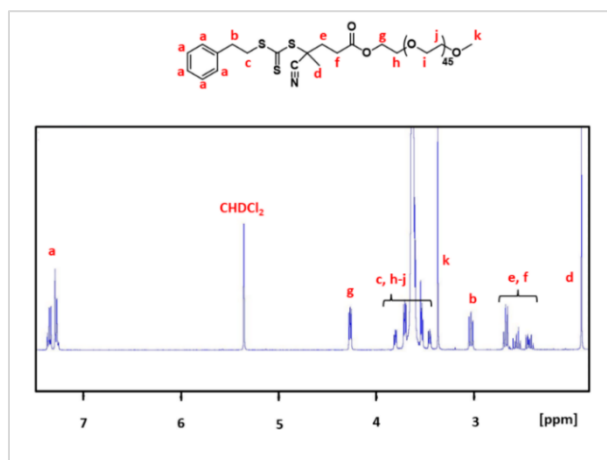


Figure 5.5. Fully assigned ^1H NMR spectra recorded in CD_2Cl_2 and at 298K for a PEG_{45} -PETTC macro-CTA. A mean degree of esterification of 94% was calculated by comparison of the integral values of aromatic proton signals (a) at 7.2 – 7.4 ppm against the PEG backbone (c, d, h-k) at 3.3 - 3.9 ppm.

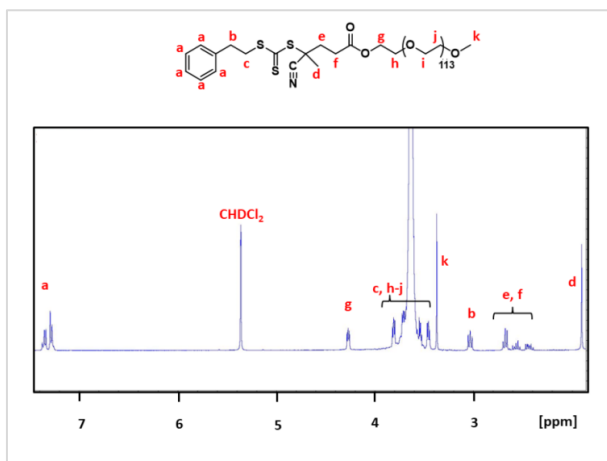


Figure 5.6. Fully assigned ^1H NMR spectra recorded in CD_2Cl_2 and at 298K for a PEG_{113} -PETTC macro-CTA. A mean degree of esterification of 95% was calculated by comparison of the integral values of aromatic proton signals (a) at 7.2 – 7.4 ppm against the PEG backbone (c, d, h-k) at 3.3 - 3.9 ppm.

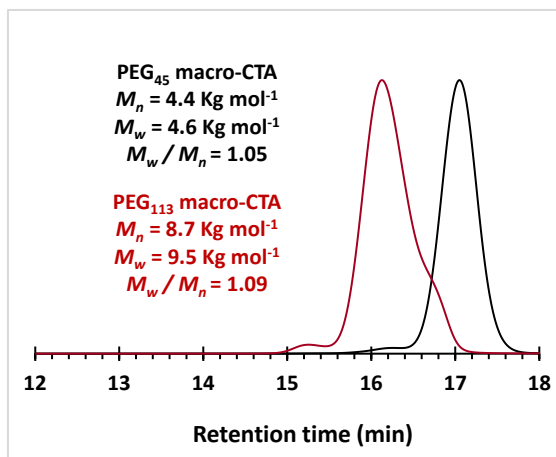
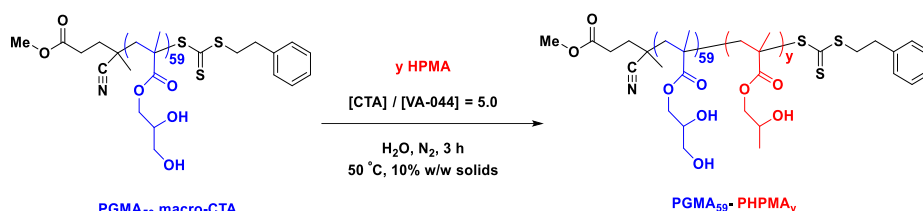


Figure 5.7. Number-average (M_n) and weight-average (M_w) molecular weight data obtained for PEG₄₅ and PEG₁₁₃ macro-CTAs. Data was obtained by DMF GPC calibrated with sixteen mono-disperse poly(methyl methacrylate) standards.

5.3 Synthesis of [(1- n) PGMA₅₉ + n PEG₄₅]-PHPMA _{γ} Diblock Copolymer Nanoparticles *via* RAFT Aqueous Dispersion Polymerization of HPMA

In control experiments, a series of PGMA₅₉-PHPMA _{γ} diblock copolymer nanoparticles ($n = 0$) were prepared *via* RAFT aqueous dispersion polymerisation of HPMA at 44 °C. The synthesis of all block copolymers was performed at a fixed solids content of 10% w/w for 4 h (see Scheme 5.5). The target PHPMA DP (γ) was systematically varied from 102 up to 306. High conversions ($\geq 99\%$) were achieved. DMF GPC analysis confirmed high blocking efficiency of the PGMA₅₉ macro-CTA and the resulting diblock copolymers exhibited low M_w / M_n values (< 1.20), with an increase in M_n when targeting higher PHPMA DP (see Table 5.1). An example DMF GPC chromatogram for PGMA₅₉-PHPMA _{γ} block copolymer is shown in Figure 5.8.



Scheme 5.5. Reaction scheme for the synthesis of PGMA₅₉-PPHMA_y diblock copolymers *via* the RAFT aqueous dispersion of HPMA. Synthesis were performed at a fixed solids concentration of 10% w/w.

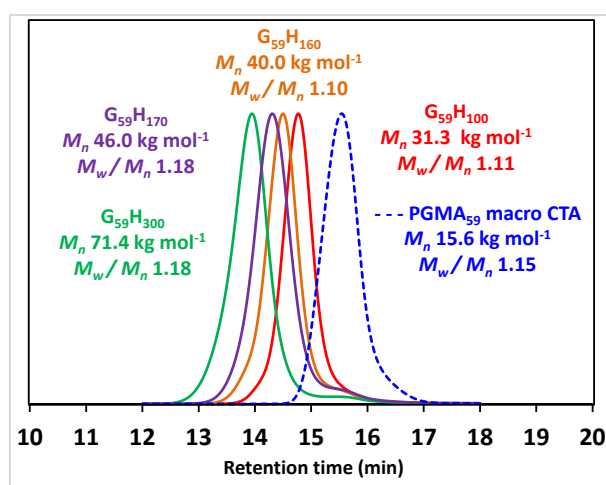


Figure 5.8. DMF GPC analysis of a series of PGMA₅₉-PPHMA_y diblock copolymers and the corresponding PGMA₅₉ macro-CTA. Molecular weight data is calculated against a series of near-monodisperse PMMA standards. For clarity, G = PGMA; H = PPHMA.

TEM studies were performed to investigate the effect of increasing the PPHMA DP on the particle morphology. TEM studies were conducted on dried 0.1% w/w aqueous dispersions that were prepared at room temperature to assess the nanoparticle morphology. In agreement with previous reports (Blanazs *et al.*, 2012a), the particle morphology increased from spheres to

worms and then to vesicles when targeting higher PHPMA DPs. Representative TEM images of spheres, worms and vesicles are shown in Figure 5.9.

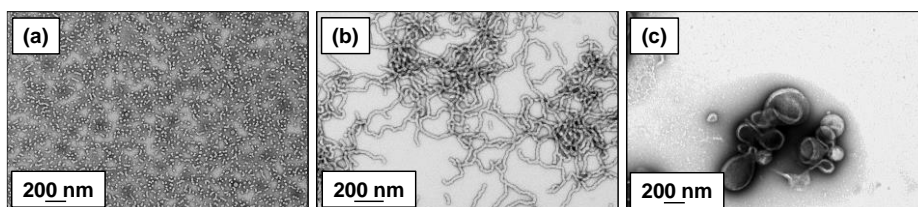
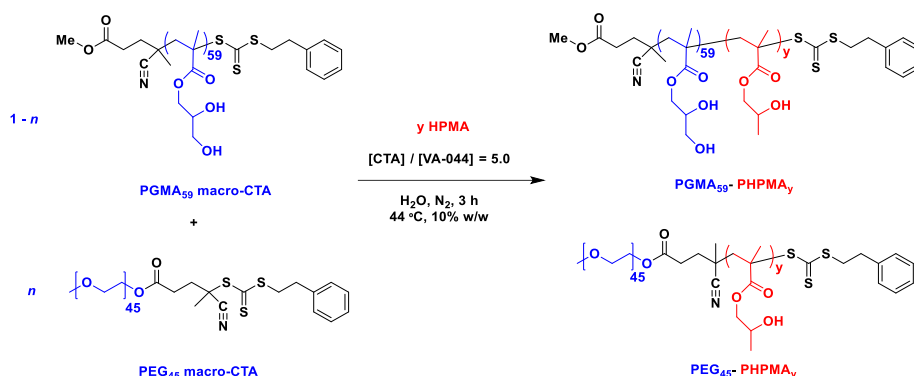


Figure 5.9. Representative TEM images obtained for PGMA₅₉-PHPMA_y diblock copolymer, (a) spheres where $y = 120$; (b) worms where $y = 160$; (c) vesicles where $y = 300$.

In order to prepare block copolymer worms with a reduced hydroxyl surface functionality, a binary macro-CTA approach was used to prepare a series of PEG-stabilised nanoparticles with the general formula $[(1-n) \text{ PGMA} + n \text{ PEG}_{45}]\text{-PHPMA}_y$ (see Scheme 5.6). Both n and y were systematically varied at a fixed solids concentration of 10% w/w. Monomer conversions of >99% were calculated from ^1H NMR spectroscopy for all block copolymer compositions, thus incorporation of PEG₄₅ does not affect monomer conversion. DMF GPC studies indicated high blocking efficiencies of both the PEG₄₅ and PGMA₅₉ macro-CTAs. In addition, ^1H NMR spectroscopy was used to confirm the composition of the targeted block copolymer *via* comparison of the integral value of the proton signals of the PGMA and PHMA methacrylic backbone and pendant PHPMA methyl side-groups at 0.8 – 2.4 ppm to the integral value of the proton signals for PEG and PGMA and PHPMA side-group protons at 3.7 – 4.2 ppm. An example DMF GPC chromatogram is shown in Figure 5.10.



Scheme 5.6. Reaction scheme for the synthesis of diblock copolymers with the general formula: $[(1-n) \text{PGMA} + n \text{PEG}_{45}] \text{-PHPMA}_y$ via RAFT aqueous dispersion polymerisation of HPMA, where n and y were systematically varied.

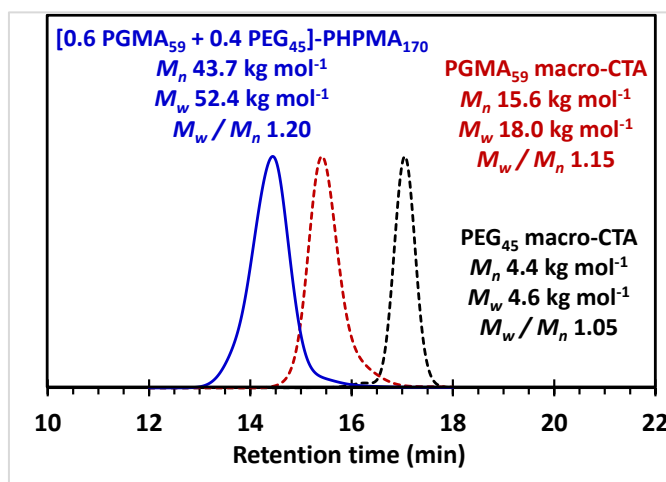


Figure 5.10. Number-average (M_n) and weight-average (M_w) molecular weight data obtained for the diblock copolymer $[0.6 \text{PGMA}_{59} + 0.4 \text{PEG}_{45}] \text{-PHPMA}_{169}$ and PEG₄₅ and PGMA₅₉ macro-CTAs. Data was obtained by DMF GPC calibrated with sixteen monodisperse poly(methyl methacrylate) standards.

Phase diagrams are vital for the development of PISA-based syntheses, since they enable pure (rather than mixed phase) block copolymer morphologies to be targeted with good reproducibility. A detailed phase diagram was constructed by characterisation of the copolymer morphology using post-mortem TEM for each block copolymer composition. This phase diagram is shown in Figure 5.11 with several representative TEM images. This systematic approach was essential to enable targeting of the pure worm phase, which critically depended on both n and y values. No self-assembly is observed when the PHPMA DP is very low ($y = 90$), regardless of the n value, in line with previous findings (Blanazs *et al.*, 2011), where the particle nucleation does not occur until a PHPMA DP of approximately 80 for a PGMA₄₇ macro-CTA. Increasing the PHPMA DP to 110 results in sterically-stabilised nanoparticles with spherical and vesicular morphology, or a mixed phase comprising both. A pure sphere phase was identified at PHPMA DPs between 100 and 120 when $n = 0$. A relatively broad pure worm phase was observed when $y = 130 - 170$ [see Figure 5.11 (a)]. At higher PHPMA DPs a mixed phase of worms and vesicles was identified. Unfortunately, the addition of non-hydroxylated PEG₄₅ into the stabiliser block ($n > 0$) resulted in the loss of a pure worm phase. Instead, pure spherical phases, mixed worm/vesicle phases and pure vesicles phases were observed [see Figure 5.11 (b) and Figure 5.11 (c)]. Furthermore, significant precipitation was observed when $n = 1$ (i.e. PEG₄₅-PHPMA _{y} diblock copolymers) corresponding to a loss of colloidal stability. In view of these results, it was envisaged that increasing the molecular weight of the PEG macro-CTA may allow access to a pure worm phase where $n > 0$.

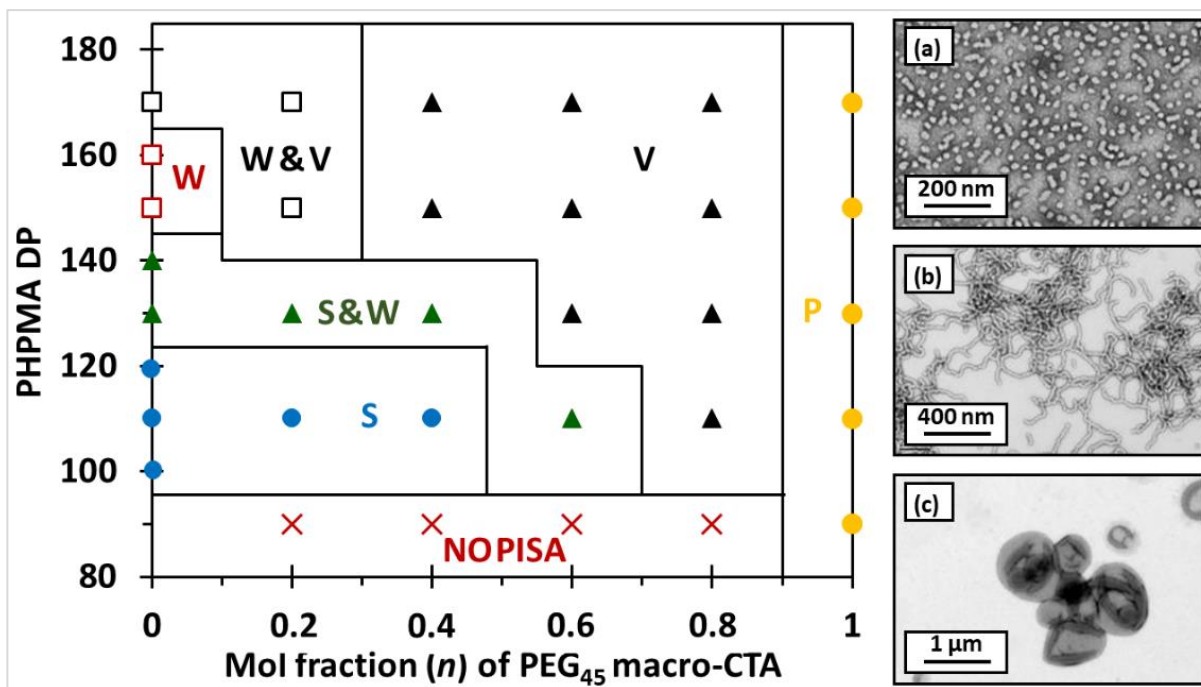
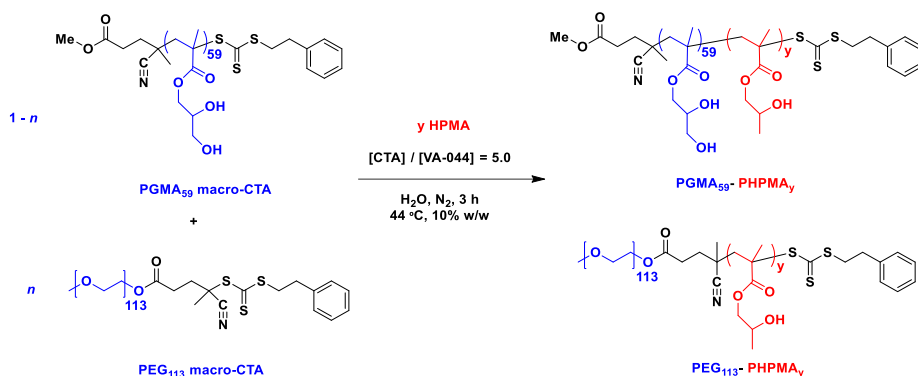


Figure 5.11. Phase diagram constructed for the RAFT aqueous dispersion polymerisation of HPMA at 10% w/w and 44 °C using a binary mixture of non-hydroxylated PEG₄₅ and hydroxylated PGMA₅₉ macro-CTAs. The general formula for this phase diagram is $[(1-n) \text{ PGMA} + n \text{ PEG}_{45}] \text{-PHPMA}_y$, where n is the PEG₄₅ mol fraction and y is the PHPMA DP. Three representative TEM images are shown for (a) spheres when $n = 0.00$ and $y = 120$; (b) worms when $n = 0.00$ and $y = 160$; (c) vesicles when $n = 0.40$ and $y = 170$.

5.4 Synthesis of [(1-*n*) PGMA₅₉ + *n* PEG₁₁₃]-PHPMA_{*y*} Diblock Copolymer Nanoparticles *via* RAFT Aqueous Dispersion Polymerization of HPMA

Previously, Armes and co-workers have synthesised the non-hydroxylated PEG₁₁₃-PHPMA_{*n*} or hydroxylated PGMA₄₇-PHPMA_{*n*} block copolymer worms by RAFT aqueous dispersion polymerisation of HPMA (Blanazs *et al.*, 2012; Warren *et al.*, 2014). A binary macro-CTA approach was used to prepare a series of nanoparticles with the general formula: [(1-*n*) PGMA + *n* PEG₁₁₃]-PHPMA_{*y*} *via* RAFT aqueous dispersion polymerisation of HPMA, where *n* and *y* were systematically varied at a constant concentration of 10% w/w (see Scheme 5.7). As in the previous case, the copolymer morphology is determined by the molar ratio of PEG₁₁₃ and PGMA₅₉ macro-CTAs and the target PHPMA DP. For all syntheses reported, > 99% monomer conversion was calculated by ¹H NMR spectroscopy. In addition, ¹H NMR spectroscopy was used to confirm the composition of the targeted block copolymer *via* comparison of the integral value of the proton signals for PGMA and PHPMA methacrylic backbone and pendant methyl side-group at 0.8 – 2.4 ppm to the integral value of the proton signals for PEG, PGMA, and PHPMA side-group protons at 3.7 – 4.2 ppm. DMF GPC studies indicated high blocking efficiencies for both the PGMA₅₉ and PEG₁₁₃ macro-CTAs (see Figure 5.12). A detailed phase diagram for [(1-*n*) PGMA₅₉ + *n* PEG₁₁₃]-PHPMA_{*y*} diblock copolymers is shown in Figure 5.13. Particle morphologies for each block copolymer formulation were assigned by visual inspection of TEM images, which were prepared at room temperature.



Scheme 5.7. Synthesis of $[(1-n) \text{ PGMA}_{59} + n \text{ PEG}_{113}]$ -PHPMA_y Diblock Copolymer Nanoparticles via RAFT Aqueous Dispersion Polymerization of HPMA.

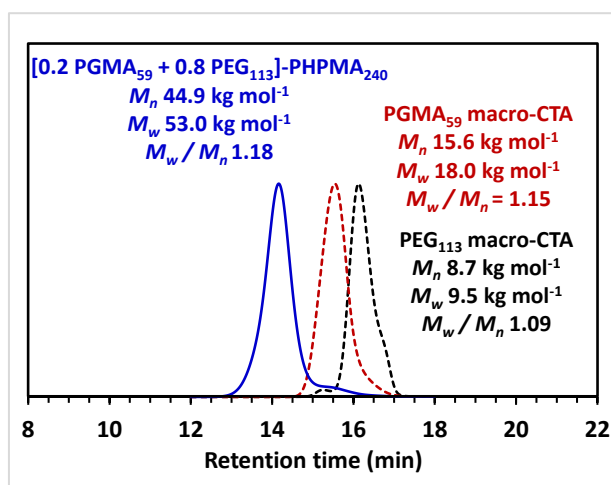


Figure 5.12. Number-average (M_n) and weight-average (M_w) molecular weight data obtained for the diblock copolymer $[0.2 \text{ PGMA}_{59} + 0.8 \text{ PEG}_{113}]$ -PHPMA₂₄₀, PEG₁₁₃ and PGMA₅₉ macro-CTAs. Data was obtained by DMF GPC calibrated with sixteen mono-disperse poly(methyl methacrylate) standards.

C5. RAFT mediated PISA of hydroxylated block copolymer nanoparticles

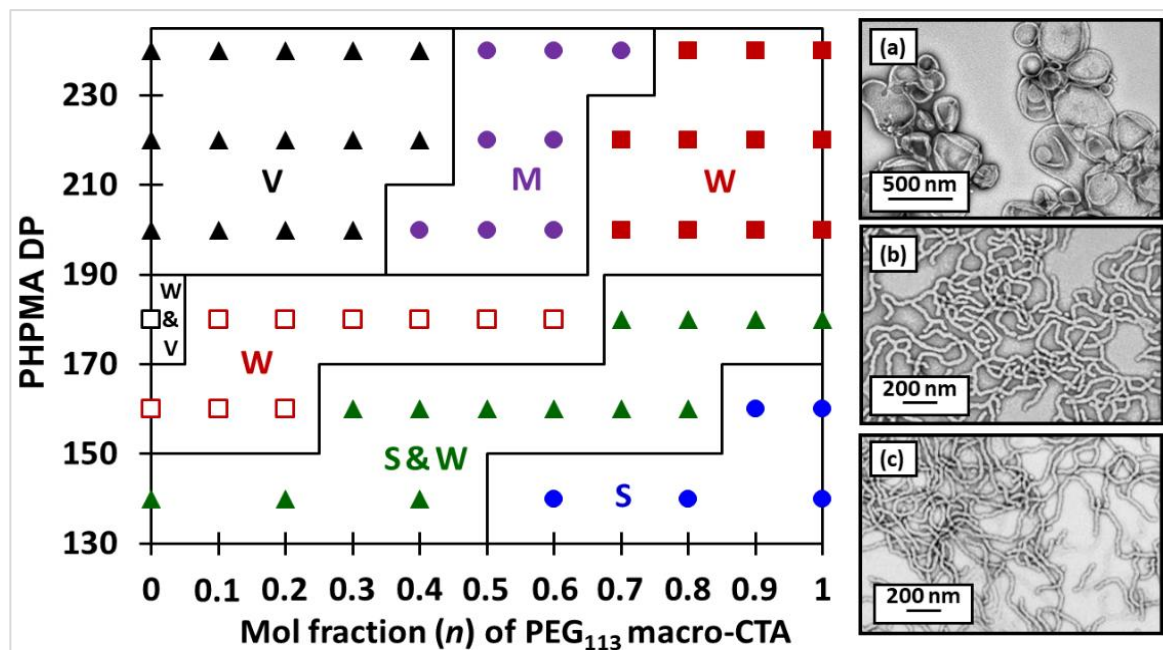


Figure 5.13. Phase diagram constructed for the RAFT aqueous dispersion polymerisation of HPMA at 10% w/w and 50 °C using a binary mixture of non-hydroxylated PEG₁₁₃ and hydroxylated PGMA₅₉ macro-CTAs. The general formula for this phase diagram is [(1- n) PGMA + n PEG₁₁₃]-PHPMA y], where n is the PEG₁₁₃ mol fraction and y is the PHPMA DP. Phase regions consist of spheres (S), worms (W), vesicles (V), mixed (M) or precipitate (P). The filled red squares indicate block copolymer worms that undergo an irreversible worm-to-sphere transition on cooling, whereas this transition is reversible for the block copolymer worms indicated by the open red squares. Three representative TEM images are shown for (a) vesicles where $n = 0.20$, (b) worms where $n = 0.70$ and (c) worms where $n = 1.00$ for a fixed PHPMA DP (y) of 200.

Inspecting the phase diagram allows visualisation of broad pure worm and vesicle phases. For example, a wide worm phase space is identified for PHPMA DPs 140 to 180 when $n \leq 0.50$. A relatively broad pure vesicles phase was observed for n values between 0 and 0.40 when targeting PHPMA DPs from 200 to 240, which is consistent with previous reports (Blanazs *et al.*, 2012). A broad worm/sphere mixed phase was observed for n values between 0.4 and 1.0 when targeting PHPMA DPs from 140 to 240. Moreover, mixed phases comprising vesicles, lamella, worms and jellyfish were observed between the pure worm and vesicle phases for n values between 0.4 and 0.7 for PHPMA DPs ranging between 190 and 240.

As expected, the pure worm phases (filled and open red squares, Figure 5.13) formed gels at room temperature due to multiple inter-worm contacts. As aforementioned one of our aims was to identify block copolymer compositions that undergo a reversible gel-sol transition on cooling. To examine the thermoresponsive nature of these worms, the 10% w/w aqueous dispersions were cooled to an ice/water slurry at 0 °C for 30 minutes. In all cases, a gel-sol transition was observed due to a worm-to-sphere morphological transition [Figure 5.14 (a) and (b)]. When $n \leq 0.5$ this thermoresponsive transition is reversible, as warming from 0 °C to 20 °C (room temperature) induces a sphere-to-worm transition and thus regelation occurs [Figure 5.14 (c)]. However, when $n \geq 0.6$ the worm-to-sphere thermoresponsive transition is irreversible, as warming to room temperature did not result in a sol-gel transition. Further warming to 50 °C failed to induce regelation. The block copolymer compositions that reformed gels after the thermal cycle are where $n \leq 0.60$ and the PHPMA DP ≤ 180 , and are indicated in the phase diagram (Figure 5.13) by open red squares. When $n \geq 0.70$ and the PHPMA DP ≥ 200 , the samples remained as free-flowing liquids after incubation and confirm the irreversible delegation behaviour after this

thermal cycle, and are assigned as filled red squares in the phase diagram (Figure 5.13). This could be due to two reasons: (i) the increase in PHPMA DP resulting in an irreversible transition on the timescale of the experiments (48 h) or (ii) the effect of more incorporating PEG₁₁₃ into the stabiliser block considering that the PEG₁₁₃ stabilised worm-to-sphere transition is irreversible.

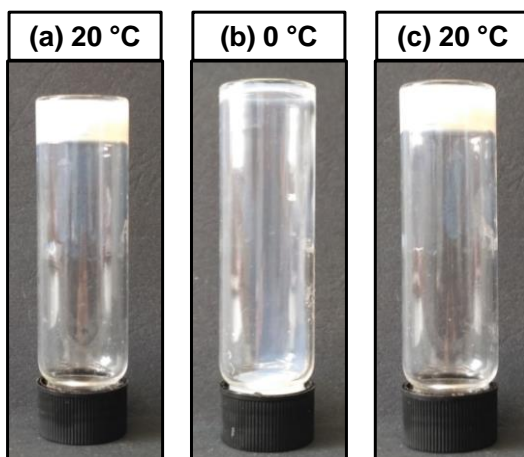


Figure 5.14. Digital photographs of a 10% w/w aqueous dispersion of [0.7 PGMA₅₉ + 0.3 PEG₁₁₃]-PHPMA₁₆₀ diblock copolymer (a) free-standing gel at 20 °C, (b) free-flowing liquid after cooling to 0 °C for 30 minutes and (c) after rewarming back to 20 °C for 30 min.

The test by visual inspection of the tube-inversion is a quick way to prove if regelation has occurred, but these experiments provide no quantitative data on gel strength and time-dependent behaviour. For this reason, oscillatory gel rheology experiments were conducted on the thermoreversible worm gels to investigate the effect of varying n on the gel strength and critical gelation

temperature. The samples selected for initial investigation were $[(1-n) \text{PGMA}_{59} + n \text{PEG}_{113}]\text{-PHPMA}_{160}$ where $n = 0.00$ (see Figure 5.15).

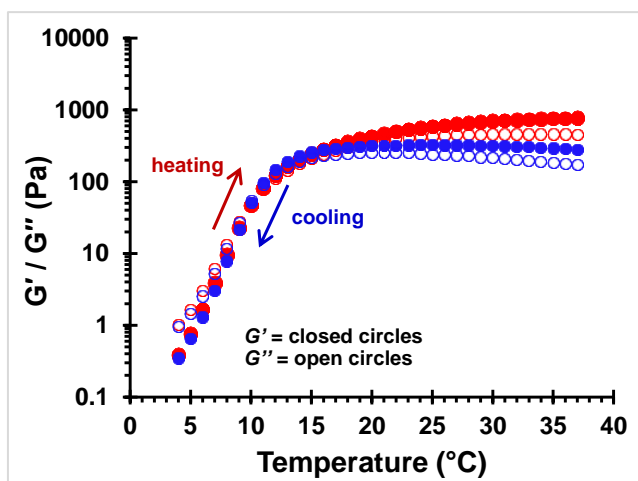


Figure 5.15. Variation in storage modulus (G' , filled circles) and loss modulus (G'') with temperature for a 10% w/w aqueous dispersion of were $[(1-n) \text{PGMA}_{59} + n \text{PEG}_{113}]\text{-PHPMA}_{160}$ where $n = 0.00$. The blue circles represent a cooling cycle from 37 °C to 4 °C and the red circles represent a heating cycle from 4 °C to 37 °C. All measurements were conducted at an angular frequency of 1 rad s^{-1} with an applied strain of 1%, with an equilibration time of 6 min per 1 °C temperature interval.

When $n = 0.00$ (i.e. $\text{PGMA}_{59}\text{-PHPMA}_{160}$) an initial G' value of 282 Pa is reported at 37 °C. On cooling to 4 °C a significant reduction in G' occurs as the PHPMA core is thermos-responsive a critical gelation at 10 °C, as judged by the cross-over in G'' and G' . Warming back to 37 °C results in regelation occurring at 11 °C but the gel strength significantly increases with respect to the initial gel strength, to 773 Pa. This is unexpected, as previous reports (Blanazs *et al.*, 2012; Verber *et al.*, 2012) have shown that the initial gel strength should be regained. An increase in gel strength could be caused by drying effects on the

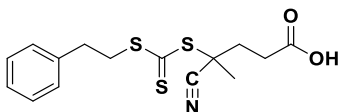
rheometer or by an increase in the mean worm persistence length, resulting in more inter-worm contacts and thus stronger gels.

Due to time constraints, the effect of increasing n (while the PHPMA DP is fixed at 160) was investigated later and these results will be published as soon as possible. These experiments had been performed to examine how introducing PEG₁₁₃ into the stabiliser block effects both the initial gel strength and the critical gelation temperature. These trials have been repeated for $n=0$ and completed for $n = 0.1$ and 0.2 . These block copolymers showed a temperature-dependent rheological behaviour similarly of the PGMA₅₄-PHPMA _{y} diblock copolymer worm gels reported (Verber *et al.*, 2012). The incorporation of a small proportion of PEG₁₁₃ into the worm corona ($n = 0.10$) has an important effect on the gel strength and rheological behaviour, due to PEG₁₁₃ acting as a more effective steric stabiliser and reducing the number of inter-worm hydrogen bonds and thus the gel strength. This trend continues as mol fraction of PEG₁₁₃ (n) incorporated into the worm corona is increased. These essays have determined that PGMA₅₉ and PEG₁₁₃ are compatible steric stabiliser polymers in PISA formulations, and it can be used to synthesize block copolymer worm gels that experiment undergo reversible degelation upon cooling. However, it is not possible to prepare block copolymer worms with a significantly high proportion of PEG in the nanoparticle corona.

5.5 Experimental section

5.5.1 Synthesis of RAFT Agents

4-Cyano-4-(2-phenylethanesulfanyl-thiocarbonyl)sulfanyl-pentanoic acid [(PETTC) RAFT agent]

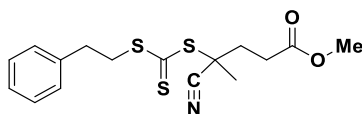


PETTC RAFT agent was synthesised according to a previous protocol (Rymaruk *et al.*, 2016). 2-Phenylethanethiol (10.5 g, 76 mmol) was gradually added over 10 min to a stirred suspension of sodium hydride (60% in oil) (3.15 g, 79 mmol) in diethyl ether (150 mL) at between 5 and 10 °C. Vigorous evolution of hydrogen gas was observed, and the grayish suspension was slowly transformed into a white viscous slurry of sodium phenylethanethiolate over 1 h. The reaction mixture was cooled to 0 °C, and carbon disulfide (6.0 g, 79 mmol) was gradually added to produce a thick yellow precipitate of sodium 2-phenylethanetrithiocarbonate, which was collected by filtration after 30 min and subsequently used in the next step without further purification. Solid iodine (6.3 g, 0.025 mol) was gradually added to a suspension of sodium 2-phenylethanetrithiocarbonate (11.6 g, 0.049 mol) in diethyl ether (100 mL). This reaction mixture was then stirred at room temperature for 1 h, and the insoluble white precipitate of sodium iodide was removed by filtration. The yellow–brown filtrate was washed with an aqueous solution of saturated sodium thiosulfate to remove excess iodine, dried over sodium sulfate, and then evaporated to yield bis(2-phenylethanesulfanylthiocarbonyl) disulfide (~100% yield). A solution of 4,4'-azobis(4-cyanopentanoic acid) (ACVA) (2.10 g, 0.0075 mol) and bis(2-phenylethane sulfanylthiocarbonyl) disulfide (2.13 g, 0.005 mol) in ethyl acetate (50 mL) was degassed by nitrogen bubbling and heated at reflux under a dry nitrogen atmosphere for 18 h. After removal of

the volatiles under vacuum, the crude product was washed with water (five 100 mL portions). The organic phase was concentrated and purified by recrystallized from hot ethyl acetate: hexane (4:1 v/v) then placed in a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ freezer to afford 4-Cyano-4-(2-phenylethanesulfanyl-thiocarbonyl)sulfanyl-pentanoic acid as a yellow oil (54 g, 80% yield).

^1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2 , $25\text{ }^{\circ}\text{C}$): δ 1.91 (s, 3H, $-(\text{CN})\text{CH}_3$), 2.40–2.62 (m, 2H, $-(\text{CH}_3)(\text{CN})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{OH}$), 2.64–2.87 (m, 2H, $-(\text{CH}_3)(\text{CN})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{OH}$), 3.02–3.06 (t, 2H, $-\text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{S}(\text{C}=\text{S})\text{S}$), 3.60–3.66 (t, 2H, $-\text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{S}(\text{C}=\text{S})\text{S}$), 7.25–7.40 (m, 5H, $-\text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{S}(\text{C}=\text{S})\text{S}$). ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3 , $25\text{ }^{\circ}\text{C}$): δ 24.9 (CH_3), 29.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{OH}$), 33.5 ($\text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 34.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{OH}$), 38.0 ($\text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 46.3 ($\text{SC}(\text{CH}_3)(\text{CN})\text{CH}_2$), 118.9 ($\text{SC}(\text{CH}_3)(\text{CN})\text{CH}_2$), 126.9–128.6, 139.2 (PhCH_2), 177.1 ($\text{C}=\text{O}$), 216.4 ($\text{C}=\text{S}$). MS (ES^+) m/z calcd: 339.0 Found: 339.0 Anal. Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{NO}_2\text{S}_3$: C, 53.07; H, 5.05; N, 4.13; S, 28.33. Found C, 53.02; H, 5.72; N, 3.88; S, 27.21.

MePETTC RAFT agent



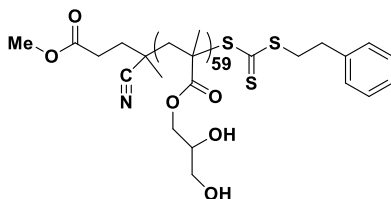
MePETTC was synthesised according to a previous protocol (Penfold *et al.*, 2016a). A 250 mL round-bottomed flask was flame-dried under vacuum and cooled to $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, then charged with a magnetic stirrer bar, PETTC RAFT agent (5.6 g, 16.5 mmol) and anhydrous dichloromethane (56 g, 42 mL). The flask was immersed in an ice bath to $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 min. DMAP (450 mg, 3.7 mmol) and excess methanol (2.8 g, 8.74 mmol) were added and then N,N' -

dicyclohexylcarbodiimide (3.6 g, 17.3 mmol) was gradually added over 5 min. The reaction was stirred overnight at 20 °C. *N,N'*-Dicyclohexylurea was isolated *via* filtration and the crude product was purified by column chromatography (silica gel 60, dichloromethane eluent) and dried in a vacuum oven overnight to isolate a viscous yellow-orange oil (MePETTC, 39.7 g, 89%). ^1H NMR spectroscopy and mass spectrometry analysis confirmed the chemical structure expected for MePETTC.

^1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2 , 25 °C): δ 1.86 (s, 3H, $-\text{C}(\text{CN})-\text{CH}_3$), 2.32-2.61 (m, 2H, $-(\text{CH}_3)(\text{CN})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 2.64-2.74 (t, 2H, $-(\text{CH}_3)(\text{CN})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe}$), 2.96-3.05 (t, 2H, $-\text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{S}(\text{C}=\text{S})\text{S}$), 3.56-3.63 (t, 2H, $-\text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{S}(\text{C}=\text{S})\text{S}$), 3.68 (s, 3H, $-\text{COOCH}_3$), 7.20-7.36 (m, 5H, $-\text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{S}(\text{C}=\text{S})\text{S}$). HRMS (ES^+) m/z calcd: 354.1; Found: 354. Anal. Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{NO}_2\text{S}_3$: C, 54.36; H, 5.42; N, 3.96; S, 27.21 Found C, 53.70; H, 5.44; N, 3.82; S, 26.21.

5.5.2 Synthesis of Macro-Chain Transfer Agents

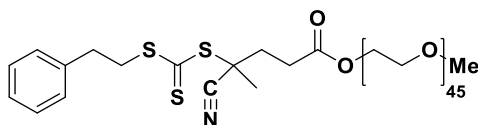
MePETTC-PGMA₅₉ Macro-Chain Transfer Agent by RAFT Solution Polymerisation



A 250 mL round-bottomed flask was charged with GMA (27.02 g, 168.9 mmol), MePETTC (1.0018 g, 2.82 mmol), AIBN (92.8 mg, 0.57 mmol) and ethanol (42.01 g) to afford a 40% w/w (target DP = 60, $[\text{MePETTC}] / [\text{AIBN}]$ molar ratio = 5.0). The flask was sealed, placed in an ice bath and degassed under N_2 for 30 min at 0 °C. The flask was placed in a preheated oil bath set at 70 °C for 2.5 hours. The GMA polymerisation was quenched by exposure to air

and cooling to room temperature. ^1H NMR spectroscopy indicated a monomer conversion of 72% by comparison of the integration signal corresponding to the pendent protons at 3.4 – 4.4 ppm to that assigned to the aromatic RAFT chain end at 7.4 – 8.0 ppm. Purification was achieved by precipitation into a twenty-fold excess of dichloromethane to remove unreacted GMA monomer, followed by isolation *via* filtration. The isolated crude PGMA macro-CTA was re-dissolved in the minimum amount of methanol, precipitated into a ten-fold excess of dichloromethane and again isolated *via* filtration. The purified macro-CTA was dissolved in water, any residual dichloromethane was removed under reduced pressure using a rotary evaporator and then freeze-drying was conducted for 48 h to afford a yellow powder. ^1H NMR studies indicated no residual GMA monomer and end-group analysis indicated a mean degree of polymerisation of 59, with a RAFT agent efficiency of 75 %. DMF GPC studies indicated an M_n of 15,500 g mol $^{-1}$ and an M_w / M_n 1.15 against near mono-disperse poly(methyl methacrylate) calibration standards.

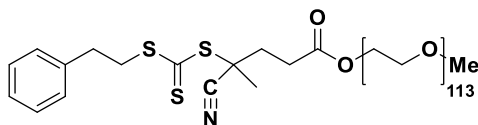
Poly(ethylene glycol) $_{45}$ Macro-Chain Transfer Agent



PEG $_{45}$ -OH (M_n = 2000 g mol $^{-1}$, mean DP = 45, 40.4 g, 20.2 mmol) was dissolved in toluene (ca. 800 mL), then the solution was azeotropically distilled under a nitrogen atmosphere to remove ca. 500 mL of toluene then cooled to room temperature. The solution was cooled to 0 °C and anhydrous DCM was added (ca. 300 mL) to fully solubilise PEG $_{45}$ -OH. Glassware for the following steps was flame dried under vacuum. DCC (12.5 g, 60.6 mmol) and DMAP

(0.247 g, 20.2 mmol) were co-dissolved in anhydrous dichloromethane (DCM, ca. 10 mL) then added to the PEG solution dropwise, with stirring. Further anhydrous DCM (2 x ca. 10 mL) was used to rinse all residues into the reaction vessel. PETTC (10.3 g, 30.4 mmol) dissolved in anhydrous DCM (ca. 10 mL) was added dropwise to the stirred reaction mixture. Further anhydrous DCM (2 x ca. 10 mL) was used to rinse all residues into the reaction vessel. The reaction mixture was stirred at room temperature for 16 hours. PEG₄₅-PETTC macro-CTA was isolated *via* precipitation into cold diethyl ether (-78 °C, 1 L). The purification process was repeated twice, before drying the final precipitate in a vacuum oven (40 °C) until dry. The dried solid was ground to yield a fine, mid-yellow powder (31.5 g, 67%). A degree of esterification of 95% was determined via NMR-based end-group analysis. DMF GPC studies indicate an M_n of 4,400 g mol⁻¹, an M_w of 4,600 g mol⁻¹ and an M_w/M_n of 1.05 against near mono-disperse poly(methyl methacrylate) (PMMA) standards.

Poly(ethylene glycol)₁₁₃ Macro-Chain Transfer Agent



PEG₁₁₃-OH (M_n = 4000 g mol⁻¹, mean DP = 113, 39.9 g, 7.98 mmol) was dissolved in toluene (ca. 800 mL), then the solution was azeotropically distilled under a nitrogen atmosphere to remove ca. 500 mL of toluene then cooled to room temperature. The solution was cooled to 0 °C and anhydrous DCM was added (ca. 300 mL) to fully solubilise PEG₄₅-OH. Glassware for the following steps was flame dried under vacuum. DCC (4.94 g, 23.9 mmol) and DMAP (0.0975 g, 0.798 mmol) were co-dissolved in anhydrous dichloromethane (DCM, ca. 10 mL) then added to the PEG solution dropwise, with stirring.

Further anhydrous DCM (2 x ca. 10 mL) was used to rinse all residues into the reaction vessel. PETTC (4.07 g, 12.0 mmol) dissolved in anhydrous DCM (ca. 10 mL) was added dropwise to the stirred reaction mixture. Further anhydrous DCM (2 x ca. 10 mL) was used to rinse all residues into the reaction vessel. The reaction mixture was stirred at room temperature for 16 hours. PEG₁₁₃-PETTC macro-CTA was isolated *via* precipitation into diethyl ether (25 °C, 1 L). The purification process was repeated twice, before drying the final precipitate in a vacuum oven (40 °C) until dry. The dried solid was ground to yield a fine, mid-yellow powder (40.4 g, 95%). A degree of esterification of 95% was determined via NMR-based end-group analysis. DMF GPC studies indicate an M_n of 8,700 g mol⁻¹, an M_w of 9,500 g mol⁻¹ and an M_w / M_n of 1.09 against near mono-disperse poly(methyl methacrylate) (PMMA) standards.

5.5.3 Synthesis of [(1-*n*) PGMA₅₉ + *n* PEG₄₅]-PHPMA_{*y*} and [(1-*n*) PGMA₅₉ + *n* PEG₁₁₃]-PHPMA_{*y*}, Diblock Copolymer Nanoparticles *via* RAFT Aqueous Dispersion Polymerisation of HPMA

A typical protocol for the synthesis of [0.60 PGMA₅₉+0.40 PEG₁₁₃]-PHPMA₁₆₀ block copolymers via RAFT aqueous dispersion polymerisation was conducted as follows. A 14 mL sample vial was charged with HPMA (0.1872 g, 1.30 mmol), PEG₁₁₃ macro-CTA (95% esterification, 0.0183 g, 3.26 μmol), PGMA₅₉ macro-CTA (0.0476 g, 4.86 μmol), VA-044 (0.52 mg, 1.61 μmol, ([PGMA₅₉] + [PEG₁₁₃] / [VA-044] = 5) and water (2.275 g) to afford a 10% w/w, yellow translucent solution. The reaction vial was sealed, cooled in ice for 5 minutes and then degassed with N₂ for 30 min and then placed in a preheated oil bath set at 44 °C for 3 h. Polymerisation was quenched by exposing to air and cooling to room temperature. ¹H NMR studies indicated a monomer conversion of >99%. DMF GPC studies indicated an M_n of 32.8 kg mol⁻¹ and a

M_w/M_n of 1.19. TEM studies were performed to assign a particle morphology to each block copolymer. Summary tables of all the block copolymer composition, monomer conversion and molecular weight data for these syntheses are included in the Tables 5.1 and 5.2.

Table 5.1. Summary of the target composition, determined molecular weight and particle morphology for [(1-*n*) PGMA₅₉ + *n* PEG₄₅]-PHPMA_{*y*}.

Mol fraction PEG ₄₅ (<i>n</i>)	Target PHPMA DP (<i>y</i>)	Conversion (%) ^a	<i>M_n</i> (kg mol ⁻¹) ^b	<i>M_w</i> / <i>M_n</i> ^b	Morphology ^c
0.20	90	> 99	24.9	1.12	No PISA
0.40	90	> 99	29.4	1.15	No PISA
0.60	90	> 99	30.9	1.14	No PISA
0.80	90	> 99	21.9	1.18	No PISA
1.00	90	> 99	25.3	1.91	P
0.00	100	> 99	31.3	1.11	S
0.00	110	> 99	33.3	1.12	S
0.20	110	> 99	31.3	1.14	S
0.40	110	> 99	31.1	1.15	S
0.60	110	> 99	30.9	1.12	S & W
0.80	110	> 99	28.3	1.11	V
1.00	110	> 99	23.1	1.16	P
0.00	120	> 99	34.3	1.12	S
0.00	130	> 99	36.8	1.14	S & W
0.20	130	> 99	33.6	1.13	S & W
0.40	130	> 99	33.3	1.13	S & W
0.60	130	> 99	33.0	1.12	V
0.80	130	> 99	31.6	1.10	V
1.00	130	> 99	29.4	2.14	P
0.00	140	> 99	37.4	1.13	S & W
0.00	150	> 99	43.6	1.15	W
0.20	150	> 99	38.4	1.14	W & V
0.40	150	> 99	36.7	1.15	V
0.60	150	> 99	34.5	1.13	V
0.80	150	> 99	36.6	1.50	V
1.00	150	> 99	37.1	6.97	P
0.00	160	> 99	40.0	1.10	W
0.00	170	> 99	46.0	1.18	W & V
0.20	170	> 99	45.7	1.14	W & V

0.40	170	> 99	43.7	1.20	V
0.60	170	> 99	34.4	1.16	V
0.80	170	> 99	35.6	1.52	V
1.00	170	> 99	27.2	1.40	P
0.00	200	> 99	47.8	1.18	W & V
0.00	250	> 99	53.9	1.20	W & V
0.00	300	> 99	71.4	1.18	V

^a Calculated by ¹H NMR spectroscopy.

^b Molecular weight data was determined by DMF GPC chromatography and is calculated relative to PMMA standards.

^c Determined by TEM analysis.

Abbreviations: S = spheres, W = worms, V = vesicles, P = precipitate.

Table 5.2. Summary of the target composition, determined molecular weight and particle morphology for [(1-*n*) PGMA₅₉ + *n* PEG₁₁₃]-PHPMA_{*y*}.

Mol fraction PEG ₁₁₃ (<i>n</i>)	Target PHPMA DP (<i>y</i>)	Conversion ^a (%)	<i>M_n</i> (kg mol ⁻¹) ^b	<i>M_w</i> / <i>M_n</i> ^b	Morphology ^c
0.00	140	> 99	35.4	1.13	W&S
0.20	140	> 99	34.8	1.15	W&S
0.40	140	> 99	34.6	1.14	W&S
0.60	140	> 99	34.1	1.15	S
0.80	140	> 99	33.6	1.14	S
1.00	140	> 99	33.4	1.12	S
0.00	160	> 99	39.2	1.15	W
0.10	160	> 99	42.5	1.12	W
0.20	160	> 99	34.5	1.17	W
0.30	160	> 99	39.8	1.12	W&S
0.40	160	> 99	32.8	1.19	W&S
0.50	160	> 99	40.3	1.12	W&S
0.60	160	> 99	33.5	1.18	W&S
0.70	160	> 99	40.0	1.13	W&S
0.80	160	> 99	33.2	1.16	W&S
0.90	160	> 99	39.0	1.10	S
1.00	160	> 99	37.5	1.11	S
0.00	180	> 99	46.9	1.25	W&V
0.10	180	> 99	39.0	1.17	W
0.20	180	> 99	32.0	1.24	W
0.30	180	> 99	37.4	1.16	W
0.40	180	> 99	34.7	1.17	W
0.50	180	> 99	42.2	1.13	W
0.60	180	> 99	36.8	1.17	W
0.70	180	> 99	39.0	1.14	W&S
0.80	180	> 99	36.0	1.17	W&S
0.90	180	> 99	38.6	1.13	W&S
1.00	180	> 99	42.6	1.12	W&S
0.00	200	> 99	40.1	1.20	V

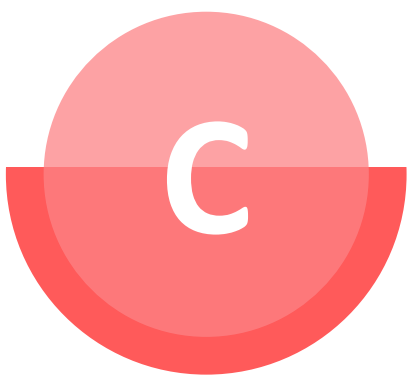
0.10	200	> 99	37.9	1.27	V
0.20	200	> 99	32.6	1.23	V
0.30	200	> 99	45.4	1.16	V
0.40	200	> 99	39.9	1.20	M
0.50	200	> 99	45.0	1.16	M
0.60	200	> 99	45.9	1.14	M
0.70	200	> 99	32.3	1.42	W
0.80	200	> 99	29.6	1.19	W
0.90	200	> 99	29.5	1.23	W
1.00	200	> 99	28.7	1.18	W
0.00	220	> 99	49.3	1.21	V
0.10	220	> 99	44.2	1.20	V
0.20	220	> 99	45.8	1.18	V
0.30	220	> 99	46.8	1.16	V
0.40	220	> 99	40.6	1.21	V
0.50	220	> 99	47.0	1.17	M
0.60	220	> 99	38.8	1.16	W
0.70	220	> 99	48.4	1.14	W
0.80	220	> 99	42.2	1.17	W
0.90	220	> 99	54.5	1.12	W
1.00	220	> 99	42.5	1.15	W
0.00	240	> 99	52.8	1.17	V
0.10	240	> 99	51.5	1.18	V
0.20	240	> 99	53.3	1.21	V
0.30	240	> 99	44.6	1.19	V
0.40	240	> 99	43.8	1.22	V
0.50	240	> 99	43.9	1.22	M
0.60	240	> 99	52.1	1.14	M
0.70	240	> 99	40.9	1.21	M
0.80	240	> 99	44.9	1.18	W
0.90	240	> 99	44.1	1.19	W
1.00	240	> 99	42.2	1.13	W

^a Calculated by ¹H NMR spectroscopy.

^b Molecular weight data was determined by DMF GPC chromatography and is calculated relative to PMMA standards.

^c Determined by TEM analysis.

Abbreviations: S = spheres, W = worms, V = vesicles, P = precipitate.



Conclusiones

El objetivo general de esta tesis es la preparación de poliuretanos y politriazoles biodegradables y biocompatibles, así como el estudio de sus potenciales aplicaciones como sistemas de liberación controlada de fármacos y de material genético.

Ha sido posible obtener este tipo de polímeros a partir de los monómeros adecuados que fueron previamente sintetizados. Se obtuvieron monómeros funcionalizados basados en D-manitol y L-arabinitol conteniendo grupos hidroxilo y azido para la obtención de poliuretanos y politriazoles, respectivamente. También se han sintetizado tri- y tetra-*O*-alil derivados de estos alditos para derivatizaciones posteriores conducentes a poliuretanos catiónicos. También se han sintetizado diisocianatos y dialquinos conteniendo grupos disulfuro sensibles a las condiciones reductoras de los medios hipóxicos.

A partir de los monómeros anteriores se ha preparado con éxito una serie de homo- y copoliuretanos con buenos rendimientos, pesos moleculares generalmente elevados y baja polidispersidad. Estos polímeros presentaron naturaleza amorfa o semicristalina. Las temperaturas de transición vítrea de los copoliuretanos derivados de manitol aumentaron al incrementarse la presencia de este azúcar en las cadenas poliméricas.

Tanto los estudios de degradación mediados por glutatión bajo condiciones fisiológicas como los de degradación hidrolítica, pusieron de manifiesto que la hidrofilia inherente a los materiales estudiados juega un papel determinante en ambos procesos. Los poliuretanos con mayor contenido en manitol, y especialmente los que presentaban cierto grado de ramificación, fueron los más hidrofílicos y los que se degradaron más rápidamente. Los estudios SEM confirmaron que el proceso de degradación mediado por glutatión ocurría

tanto a nivel superficial como a nivel interno de los discos preparados a partir de estos materiales. En cambio, las degradaciones hidrolíticas tuvieron lugar principalmente en la superficie de los discos.

Se han llevado a cabo estudios preliminares de autoensamblado de los copoliuretanos de bloque, observándose la formación de polimersomas cuyos tamaños fueron determinados por DLS y microscopía.

Los estudios de liberación controlada de fármacos con una serie de poliuretanos seleccionados empleando teofilina como fármaco modelo, han demostrado una alta capacidad para actuar como sistemas matriciales. Algunos de los materiales ensayados presentaron buenos perfiles de liberación del fármaco bajo condiciones que simulaban el tracto gastrointestinal, destacando un aumento de liberación a pH característico del colon.

Los poliuretanos catiónicos basados en L-arabinitol y D-manitol fueron sintetizados con buenos rendimientos aunque presentaron bajos pesos moleculares. Sin embargo, los estudios de interacción con ADN demostraron una excelente afinidad polímero/ADN, especialmente el basado en D-manitol.

Se han sintetizado politriazoles catiónicos y no catiónicos 1,4- y 1,4/1,5-disustituídos dependiendo del método de cicloadición 1,3-dipolar empleado catalítico o térmico, respectivamente. Los politriazoles conteniendo D-manitol fueron obtenidos a partir de diferentes diazido derivados de éste y dialquinil derivados conteniendo enlaces disulfuro. El dialquinil monómero derivado de tris-(2-aminoetil)amina condujo a politriazoles conteniendo grupos amino protonables.

Para evaluar la eficacia de transfección mediada por los politriazoles catiónicos, se llevaron a cabo ensayos de transfección *in vitro* utilizando células madre embrionarias humanas, evidenciándose resultados preliminares muy significativos.

Se han llevado a cabo estudios de viabilidad celular con los polímeros catiónicos en una serie de líneas celulares cancerosas. Los poliuretanos basados en L-arabinitol y D-manitol mostraron buenos perfiles de citotoxicidad. En el caso de los politriazoles se observó estrés celular en algunas de las líneas celulares ensayadas aunque también presentaron perfiles de citotoxicidad aceptables.

Conclusions for Chapter 5

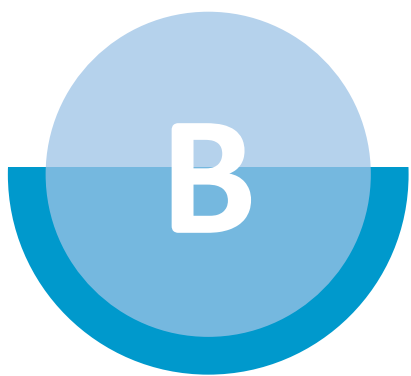
With the aim of obtaining biocompatible worm hydrogels for their application as stem cell storage medium, the studies presented in Chapter 5 have been carried out.

Two RAFT agents (carboxylic acid functionalised PETTC and neutral MePETTC) were synthesised in high yield. Mono-hydroxylated PEG₄₅ and PEG₁₁₃ precursors were reacted with PETTC to produce well-defined PEG₄₅ and PEG₁₁₃ macro-CTAs, *via* Steglich esterification, with mean degrees of esterification of 95%. In addition, a well-defined and water-soluble PGMA macro-CTA with a mean DP of 59 was prepared by RAFT polymerisation using Me-PETTC.

A binary macro-CTA approach was used to prepare a series of PGMA/PEG-HPMA stabilised nanoparticles *via* RAFT aqueous dispersion polymerisation, where composition of PGMA/PEG and HPMA were systematically varied. PISA led to the formation of a wide range of sterically-stabilised diblock copolymer

nanoparticles with high degrees of conversion and blocking efficiencies in all cases, except for some PEG₄₅ formulations that gave macroscopic precipitation and broad polydispersity values. The copolymer morphology for each composition was characterised by TEM studies, then a detailed phase diagram constructed for each PEG mean DP. The final copolymer morphology showed a strong dependency on both the mol fraction of PEG and PHPMA. In the case of the PEG₄₅ phase diagram a narrow pure worm phase was only identified. However, replacing PEG₄₅ with PEG₁₁₃ led to a phase diagram with a very broad worm phase.

Thermoresponsive studies were conducted on all the worm samples, with reversible degelation observed. The rheological investigation of the physical behaviour of pure worm gel phase for the reversible samples is currently being carried out to study the effect of PEG₁₁₃ on the initial gel strength and critical gelation temperature. These studies will give insight into an appropriate sample to investigate how much hydroxyl functionality is required to induce stem cell stasis.



Bibliografía

Ahmed M, Narain R. Progress of RAFT based polymers in gene delivery. *Prog Polym Sci.* 2013; 38(5): 767-790.

Ahmed M, Narain R. The effect of polymer architecture, composition, and molecular weight on the properties of glycopolymer-based non-viral gene delivery systems. *Biomaterials.* 2011; 32(22): 5279-5290.

Akinc A, Langer R. Measuring the pH environment of DNA delivered using nonviral vectors: Implications for lysosomal trafficking. *Biotechnol Bioeng.* 2002; 78(5): 503-508.

Appukkuttan P, Dehaen W, Fokin VV, Van der Eycken E. A Microwave-Assisted Click Chemistry Synthesis of 1,4-Disubstituted 1,2,3-Triazoles via a Copper(I)-Catalyzed Three-Component Reaction. *Org Lett.* 2004; 6(23): 4223–4225.

Aragao-Leoneti V, Campo VL, Gomes AS, Field RA, Carvalho I. Application of copper(I)-catalysed azide/alkyne cycloaddition (CuAAC) 'click chemistry' in carbohydrate drug and neoglycopolymer synthesis. *Tetrahedron.* 2010; 66(49): 9475-9492.

Baier G, Fichter M, Kreyes A, Klein K, Mailaender V, Gehring S, *et al.* Glutathione responsive hyaluronic acid nanocapsules obtained by bioorthogonal Interfacial "click" reaction. *Biomacromolecules.* 2016; 17(1): 148–153.

Bajpai AK, Shukla SK, Bhanu S, Kankane S. Responsive polymers in controlled drug delivery. *Prog Polym Sci.* 2008; 33(11): 1088-1118.

Balasubramanian V, Herranz-Blanco B, Almeida PV, Hirvonen J, Santos HA. Multifaceted polymersome platforms: Spanning from self-assembly to drug delivery and protocells. *Prog Polym Sci.* 2016; 60: 51-85.

Begines B, de Paz MV, Alcudia A, Galbis JA. Synthesis of reduction sensitive comb-like polyurethanes using click chemistry. *J Polym Sci Pol Chem*. 2016; 54(24) 3888–3900.

Begines B, Zamora F, Benito Hernández E, García-Martín MG, Galbis JA. Conformationally restricted linear polyurethanes from acetalized sugar-based monomers. *J Polym Sci Pol Chem*. 2012; 50(22): 4638–4646.

Begines B, Zamora F, de Paz MV, Hakkou K, Galbis JA. Polyurethanes Derived from Carbohydrates and Cystine-Based Monomers. *J Appl Polym Sci*. 2015; 132(3): 41304.

Begines B, Zamora F, Roffe I, Mancera M, Galbis JA. Sugar-Based Hydrophilic Polyurethanes and Polyureas. *J Polym Sci Pol Chem*. 2011; 49(9): 1953-1961.

Benito JM, Gomez-Garcia M, Ortiz C, Baussanne I, Defaye J, Fernandez JM. Optimizing saccharide-directed molecular delivery to biological receptors: Design, synthesis, and biological evaluation of glycodendrimer-cyclodextrin conjugates. *J Am Chem Soc*. 2004; 126(33): 10355–10363.

Bernabeu E, Gonzalez L, Cagel M, Gergic EP, Moretton MA, Chiappetta DA. Novel Soluplus (R)-TPGS mixed micelles for encapsulation of paclitaxel with enhanced in vitro cytotoxicity on breast and ovarian cancer cell lines. *Colloids Surf B Biointerf*. 2016; 140: 403–411.

Bies C, Lehr CM, Woodley JF. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2004; 56(4): 425-435.

Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, *et al*. T-lymphocyte-directed gene-therapy for ADA (-) SCID-initial trial results after 4 years. *Science*. 1995; 270(5235): 475-480.

Branca MA. Gene therapy: cursed or inching towards credibility. *Nat Biotechnol.* 2005; 23(5): 519-521.

Bravo R, Gutierrez T, Paredes F, Gatica D, Rodriguez AE, Pedrozo Z, *et al.* Endoplasmic reticulum: ER stress regulates mitochondrial bioenergetics. *Int J Biochem Cell B.* 2012; 44(1): 16-20.

Bueno M, Molina I, Galbis JA. Degradable "click" polyesters from erythritol having free hydroxyl groups. *Polym Degrad Stabil.* 2012; 97(9): 1662-1670.

Campiñez MD, Aguilar-de-Leyva A, Ferris C, de Paz MV, Galbis JA, Caraballo I. Study of the properties of the new biodegradable polyurethane PU (TEG-HMDI) as matrix forming excipient for controlled drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm.* 2013; 39(11): 1758-1764.

Campiñez MD, Ferris C, de Paz MV, Aguilar-De-Leyva A, Galbis JA, Caraballo I. A new biodegradable polythiourethane as controlled release matrix polymer. *Int J Pharm.* 2015; 480 (1-2): 63-72.

Casado N, Hernández G, Sardon H, Mecerreyes D. Current trends in redox polymers for energy and medicine. *Prog Polym Sci.* 2016; 52: 107–135.

Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint BG, Gross F, Yvon E, Nusbaum P *et al.* Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science.* 2000; 288(5466): 669-672.

Cavazzana-Calvo M, Payen E, Negre O, Wang G, Hehir K, Fusil F *et al.* Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia. *Nature.* 2010; 467(7313): 318-322.

Che HL, Cao SP, van Hest JCM. Feedback-Induced Temporal Control of "Breathing" Polymersomes To Create Self-Adaptive Nanoreactors. *J Am Chem Soc.* 2018; 140(16): 5356-5359.

Chen FF, Chen H, Duan X, Jia JQ, Kong J. Molecularly imprinted polymers synthesized using reduction-cleavable hyperbranched polymers for doxorubicin hydrochloride with enhanced loading properties and controlled release. *J Mater Sci.* 2016; 51(20): 9367–9383.

Chen J, Dong RN, Ge J, Guo BL, Ma PX. Biocompatible, biodegradable, and electroactive polyurethane-urea elastomers with tunable hydrophilicity for skeletal muscle tissue engineering. *ACS Appl Mater Inter.* 2015; 7(51): 28273–28285.

De Paz MV, Marin R, Zamora F, Hakkou K, Alla A, Galbis JA, *et al.* Linear polyurethanes derived from alditols and diisocyanates. *J Polym Sci Pol Chem.* 2007; 45(17): 4109-4117.

De Paz MV, Zamora F, Begines B, Ferris C, Galbis JA. Glutathione-mediated biodegradable polyurethanes derived from L-arabinitol. *Biomacromolecules.* 2010; 11(1): 269–276.

Deng RH, Derry MJ, Mable CJ, Ning Y, Armes SP. Using Dynamic Covalent Chemistry To Drive Morphological Transitions: Controlled Release of Encapsulated Nanoparticles from Block Copolymer Vesicles. *J Am Chem Soc.* 2017; 139(22): 7616-7623.

Dombrow BA. Polyurethanes. New York. Reinhold Publishing Corporation. 1957.

Ferris C, de Paz MV, Aguilar-de-Leyva A, Caraballo I, Galbis JA. Reduction-sensitive functionalized copolyurethanes for biomedical applications. *Polym Chem*. 2014; 5(7): 2370-2381.

Ferris C, De Paz MV, Galbis JA. L-Arabinitol-Based Functional Polyurethanes. *J Polym Sci Pol Chem*. 2011; 49(5): 1147-1154.

Ferris C, De Paz MV, Galbis JA. L-Arabinitol-Based Functional Polyurethanes. *J Polym Sci Pol Chem*. 2011; 49(5): 1147-1154.

Ferris C, de Paz MV, Galbis JA. Synthesis of Functional Sugar-Based Polyurethanes. *Macromol Chem Phys*. 2012; 213(5): 480-488.

Ferris C, De Paz MV, Galbis JA. Synthesis of Functional Sugar-Based Polyurethanes. *Chem Phys*. 2012; 213(5): 480-488.

Ferris C, de Paz MV, Zamora F, Galbis JA. Dithiothreitol-based polyurethanes. Synthesis and degradation studies. *Polym Degrad Stab*. 2010; 95(9): 1480-1487.

Fidalgo DM, Kolender AA, Varela O. Stereoregular poly-O-methyl [m,n]-polyurethanes derived from D-mannitol. *J Polym Sci*. 2013; 51(2): 463-470.

Floros MC, Bortolatto JF, Oliveira OB, Salvador SL, Narine SS. Antimicrobial Activity of Amphiphilic Triazole-Linked Polymers Derived from Renewable Sources. *ACS Biomater Sci Eng*. 2016; 2(3): 336-343.

Galbis E, De-Paz MV, Iglesias N, Lacroix B, Alcudia A. Core cross-linked nanoparticles from self-assembling polyfma-based micelles. Encapsulation of lipophilic molecules. *Eur Polym J*. 2017a; 89: 406-418.

Galbis JA, García-Martín MG, de Paz MV, Galbis E. Bio-based polyurethanes from carbohydrate monomers. En: Faris Yilmaz. Aspects of polyurethanes. Rijeka, Croatia-EU. F. Yilmaz (Ed.) Intech; 2017b. Capítulo 6, 155-192. DOI: 10.5772/65991; ISBN: 978-953-51-3546-3.

Galbis JA, García-Martín MG, de Paz MV, Galbis E. Synthetic polymers from sugar-based monomers. Chem Rev. 2016; 116(3): 1600-1636.

Galbis JA, García-Martín MG, de Paz MV, Galbis E. Synthetic polymers from sugar-based monomers. Chem Rev. 2016; 116(3): 1600–1636.

Galbis JA, García-Martín MG. Synthetic polymers from readily available monosaccharides. Top Curr Chem. 2010; 295: 147–176.

Galbis JA, García-Martín MG. Synthetic polymers from readily available monosaccharides. Top Curr Chem. 2010; 295: 147–176.

Gansbacher B. Report of a second serious adverse event in a clinical trial of gene therapy for X-linked severe combined immune deficiency (X-SCID) - Position of the European Society of Gene Therapy (ESGT). J Gene Med. 2003; 5(3): 261-262.

Gawronska K. Synthesis and conformations of 2,3:4,5- and 2,4:3,5-di-O-isopropylidene-D-mannitol. Carbohydr Res. 1988; 176(1): 79–85.

Green JJ, Zhou BY, Mitalipova MM, Beard C, Langer R, Jaenisch R, *et al.* Nanoparticles for Gene Transfer to Human Embryonic Stem Cell Colonies. Nano Lett. 2008; 8(10): 3126–3130.

Grillo DA, Albano JMR, Mocskos EE, Facelli JC, Pickholz M, Ferraro MB. Mechanical properties of drug loaded diblock copolymer bilayers: A molecular dynamics study. Chem Phys. 2018; 148(21): 214901. doi: 10.1063/1.5028377.

Guo ST, Huang YY, Wei T, Zhang WD, Wang WW, Lin D, *et al.* Amphiphilic and biodegradable methoxy polyethylene glycolblock-(polycaprolactone-graft-poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate)) as an effective gene carrier. *Biomaterials*. 2011; 32(3): 879–889.

Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, Morillon E, *et al.* Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest*. 2008; 118(9): 3132-3142.

Hakkou K, Bueno-Martinez M, Molina-Pinilla I, Galbis JA. Degradable Poly(ester triazole)s Based on Renewable Resources. *J Polym Sci Pol Chem*. 2015; 53(21): 2481-2493.

Han D, Tong X, Zhao Y. Block copolymer micelles with a dual-stimuli-responsive core for fast or slow degradation. *Langmuir*. 2012; 28(5): 2327–2331.

Han JF, Wang X, Liu LX, Li DX, Suyaola S, Wang TY, *et al.* "Click" chemistry mediated construction of cationic curdlan nanocarriers for efficient gene delivery. *Carbohydr Polym*. 2017; 163: 191-198.

Holub JM, Kirshenbaum K. Tricks with clicks: modification of peptidomimetic oligomers via copper-catalyzed azide-alkyne [3+2] cycloaddition. *Chem Soc Rev*. 2010; 39(4): 1325-1337.

Hou Y, Cao SP, Li XM, Wang BB, Pei YX, Wang L, *et al.* One-Step Synthesis of Dual Clickable Nanospheres via Ultrasonic-Assisted Click Polymerization for Biological Applications. *ACS Appl Mater Inter*. 2014; 6(19): 16909-16917.

Hu XL, Zhang YG, Xie ZG, Jing XB, Bellotti A, Gu Z. Stimuli-Responsive Polymersomes for Biomedical Applications. *Biomacromolecules*. 2017; 18(3): 649-673.

Huisgen R. 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angew Chem Int Ed*. 1963; 2(10): 565-598.

Jones CH, Hill A, Chen MF, Pfeifer BA. Contemporary Approaches for Nonviral Gene Therapy. *Discov Med*. 2015; 19(107): 447-454.

Kim J, Kang YC, Tzeng SY, Green JJ. Synthesis and application of poly(ethylene glycol)-co-poly(b-amino ester) copolymers for small cell lung cancer gene therapy. *Acta Biomater*. 2016; 41: 293–301.

Koetting MC, Peters JT, Steichen SD, Peppas NA. Stimulus-responsive hydrogels: theory, modern advances, and applications. *Mater Sci Eng R*. 2015; 93: 1–49.

Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions. *Angew Chem Int Ed*. 2001; 40(11): 2004 – 2021.

Kolb HC, Sharpless KB. The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discov Today*. 2003; 8(24): 1128-1137.

Kreiss P, Cameron B, Rangara R, Mailhe P, Aguerre-Charriol O, Airiau M, *et al*. Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency. *Nucleic Acids Res*. 1999; 27(19): 3792–3798.

Le Merrer Y, Dureault A, Greck C, Micaslanguin D, Gravier C, Depezay JC. Synthesis of diepoxides and diaziridines, precursors of enantiomerically pure

alpha-hydroxy and alpha-amino aldehydes or acids, from D-Mannitol. *Heterocycles*. 1987; 25: 541–548.

Li S-D, Huang L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. *Mol Pharm*. 2008; 5(4): 496–504.

Liu XL, Formanek P, Voit B, Appelhans D. Functional Cellular Mimics for the Spatiotemporal Control of Multiple Enzymatic Cascade Reactions. *Angew Chem Int Edit*. 2017; 56(51): 16233-16238.

Liu YJ, Chao H, Yao JH, Tan LF, Yuan YX, Ji LN. Ruthenium(II) complexes containing asymmetric 2-(pyrazin-2-yl)naphthoimidazole: syntheses, characterization, DNA-binding and photocleavage studies. *Inor Chim Acta*. 2005; 358 (6): 1904-1910.

Liu YM, Wenning L, Lynch M, Reineke TM. New poly(D-glucaramidoamine)s induce DNA nanoparticle formation and efficient gene delivery into mammalian cells. *J Am Chem Soc*. 2004; 126(24): 7422-7423.

Lutz JF, Zarafshani Z. Efficient construction of therapeutics, bioconjugates, biomaterials and bioactive surfaces using azide–alkyne “click” Chemistry. *Adv Drug Deliver Rev*. 2008; 60(9): 958-970.

Mancera M, Roffe I, Rivas M, Galbis JA. New derivatives of D-mannaric and galactaric acids. Synthesis of a new stereoregular Nylon 66 analog from carbohydrate-based monomers having the D-manno configuration. *Carbohydr Res*. 2003; 338(10): 1115-1119.

Marín R, de Paz MV, Ittobane N, Galbis JA, Muñoz-Guerra S. Hydroxylated linear polyurethanes derived from sugar alditols. *Macromol Chem Phys*. 2009; 210(6): 486-494.

Marín R, Muñoz-Guerra S. Linear polyurethanes made from threitol: acetalized and hidroxyalted polymers. *J Polym Sci Polym Chem*. 2008; 46(24): 7996-8012.

Mees MA, Effenberg C, Appelhans D, Hoogenboom R. Sweet Polymers: Poly(2-ethyl-2-oxazoline) Glycopolymers by Reductive Amination. *Biomacromolecules*. 2016; 17(12): 4027-4036.

Metzke M, O'Connor N, Maiti S, Nelson E, Guan Z. Saccharide-peptide hybrid copolymers as biomaterials. *Angew Chem Int Ed*. 2005; 44(40): 6529-6533.

Mintzer MA, Simanek EE. Nonviral Vectors for Gene Delivery. *Chem Rev*. 2009; 109(2): 259-302.

Moghanjoughi A, Khoshnevis D, Zarrabi A. A concise review on smart polymers for controlled drug release. *Drug Deliv and Transl Res*. 2016; 6(3): 333-340.

Molina-Pinilla I, Bueno-Martinez M, Hakkou K, Galbis JA. Linear Poly(amide triazole)s Derived from D-Glucose. *J Polym Sci Pol Chem*. 2014; 52(5): 629-638

Mondal S, Martin D. Hydrolytic degradation of segmented polyurethane copolymers for biomedical applications. *Polym Degrad Stab*. 2012; 97(8): 1553–1561.

Mori T, Tanaka R, Tanaka T. Viscoelastic properties of heterogeneous network polymers from poly(D-glutamic acid) and poly(oxyethylene glycol). *J. Polym. Sci. Pol. Phys*. 1975; 13: 11633-11642.

Mura S, Nicolas J, Couvreur P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nat Mater*. 2013; 12(11): 991–1003.

Narvekar M, Xue HY, Eoh JY, Wong HL. Nanocarrier for poorly watersoluble anticancer drugs—barriers of translation and solutions. *AAPS PharmSciTech*. 2014; 15(4) 822–833.

Nayak S, Herzog RW. Progress and prospects: immune responses to viral vectors. *Gene Ther*. 2010; 17(3): 295-304.

Nguyen MK, Alsberg E. Bioactive factor delivery strategies from engineered polymer hydrogels for therapeutic medicine. *Progr Polym Sci*. 2014; 39(7): 1235–1265.

Ohsaki M, Okuda T, Wada A, Hirayama T, Niidome T, Aoyagi H. In vitro gene Transfection using dendritic poly(L-lysine). *Bioconjugate Chem*. 2002; 13(3): 510-517.

Ong ZY, Yang C, Gao SJ, Ke XY, Hedrick JL, Yang YY. Galactose-Functionalized Cationic Polycarbonate Diblock Copolymer for Targeted Gene Delivery to Hepatocytes. *Macromol Rapid Commun*. 2013; 34(21): 1714–1720.

Palivan CG, Goers R, Najer A, Zhang XY, Car A, Meier W. Bioinspired polymer vesicles and membranes for biological and medical applications. *Chem Soc Rev*. 2016; 45(2): 377-411.

Philip AK, Philip B. Colon Targeted Drug Delivery Systems: A Review on Primary and Novel Aproaches. *Oman Med J*. 2010; 25(2): 70-78.

Putnam D, Gentry CA, Pack DW, Langer R. Polymer-based gene delivery with low cytotoxicity by a unique balance of side-chain termini. *P Natl Acad Sci USA*. 2001; 98(3): 1200-1205.

Rai Y, Pathak R, Kumari N, Sah DK, Pandey S, Kalra N, *et al.* Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. *Sci Rep.* 2018; 8: 1531.

Reineke TM. Poly(glycoamidoamine)s: Cationic glycopolymers for DNA delivery. *J Polym Sci Pol Chem.* 2006; 44(24): 6895-6908.

Rodríguez-Pulido A, Aicart E, Junquera E. Electrochemical and spectroscopic study of octadecyltrimethylammonium bromide/DNA surfoplexes. *Langmuir.* 2009; 25(8): 4402-4411.

Rosenberg LE, Schechter AN. Gene therapist, heal thyself. *Science.* 2000; 287(5459): 1751-1751.

Saenger W. Principles of nucleic acid structures; Springer-Verlag: New York, (1984).

Sáez V, Hernández E, Sanz Angulo L. Sistemas de liberación controlada de medicamentos. *Revista Iberoamericana de Polímeros.* 2002; 3(3): 1-17.

Sato T, Kakimoto S, Kano H, Nakatani M, Shinkai S, Nagasaki T. In vitro gene delivery to HepG2 cells using galactosylated 6-amino-6-deoxychitosan as a DNA carrier. *Carbohydr Res.* 2007; 342(11): 1427-1433.

Secco F, Venturini M, Biver T, Sanchez F, Prado-Gotor R, Grueso E. Solvent effects on the kinetics of the interaction of 1-pyrenecarboxaldehyde with calf thymus DNA. *J Phys Chem B.* 2012; 114 (13): 4686-4691.

Sheridan C. Gene therapy finds its niche. *Nat Biotechnol.* 2011; 29(2), 121-128.

Shi Q, Huang YB, Chen XS, Wu M, Sun J, Jing XB. Hemoglobin conjugated micelles based on triblock biodegradable polymers as artificial oxygen carriers. *Biomaterials*. 2009; 30 (28): 5077-5085.

Srinivasachari S, Liu YM, Zhang GD, Prevette L, Reineke TM. Trehalose Click Polymers Inhibit Nanoparticle Aggregation and Promote pDNA Delivery in Serum. *J Am Chem Soc*. 2006; 128(25): 8176-8184.

Such GK, Johnston APR, Liang K, Caruso F. Synthesis and functionalization of nanoengineered materials using click chemistry. *Prog Polym Sci*. 2012; 37(7): 985-1003.

Such GK, Yan Y, Johnston APR, Gunawan ST, Caruso F. Interfacing materials science and biology for drug carrier design. *Adv Mater*. 2015; 27(14): 2278–2297.

Tejero R, López D, López-Fabal F, Gómez-Garcés JL, Fernández-García M. Antimicrobial polymethacrylates based on quaternized 1,3-thiazole and 1,2,3-triazole side-chain groups. *Polym Chem*. 2015; 6(18): 3449–3459.

Teramura Y, Kaneda Y, Iwata H. Islet-encapsulation in ultra-thin layer-by-layer membranes of poly(vinyl alcohol) anchored to poly(ethylene glycol)-lipids in the cell membrane. *Biomaterials*. 2007; 28(32): 4818-4825.

Thambi T, Park JH, Lee DS. Stimuli-responsive polymersomes for cancer therapy. *Biomater Sci*. 2016; 4(1): 55-69.

Tong R, Cheng JJ. Anticancer polymeric nanomedicines. *Polym Rev*. 2007; 47(3): 345–381.

Tornøe CW, Christensen C, Meldal M. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J Org Chem*. 2002; 67(9): 3057–3064.

Totani T, Teramura Y, Iwata H. Immobilization of urokinase on the islet surface by amphiphilic poly(vinyl alcohol) that carries alkyl side chains. *Biomaterials*. 2008; 29(19): 2878–2883.

Vakil R, Kwon GS. Poly(ethylene glycol)-b-poly(epsilon-caprolactone) and PEG-phospholipid form stable mixed micelles in aqueous media. *Langmuir*. 2006; 22(23): 9723–9729.

Van Meerloo J, Kaspers GJL, Cloos J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. *Methods Mol Biol*. 2011; 731: 237–245.

Vercruysse KP, Marecak DM, Marecek JF, Prestwich GD. Synthesis and in Vitro Degradation of New Polyvalent Hydrazide Cross-Linked Hydrogels of Hyaluronic Acid. *Bioconjugate Chem*. 1997; 8(5): 686-694.

Villa-Díaz LG, Garcia-Perez JL, Krebsbach PH. Enhanced Transfection Efficiency of Human Embryonic Stem Cells by the Incorporation of DNA Liposomes in Extracellular Matrix. *Stem Cells Dev*. 2010; 19(12): 1949–1957.

Wang K, Luo GF, Liu Y, Li C, Cheng SX, Zhuo RX, *et al*. Redox-sensitive shell cross-linked PEG–polypeptide hybrid micelles for controlled drug release. *Polym Chem*. 2012; 3(4): 1084-1090.

Wang XX, Zhang J, Cheng R, Meng FH, Deng C, Zhong ZY. Facile synthesis of reductively degradable biopolymers using cystamine diisocyanate as a coupling agent. *Biomacromolecules*. 2016; 17(3): 882–890.

Wang XY, Liow SS, Wu QQ, Li C, Owh C, Li ZB, *et al.* Codelivery for Paclitaxel and Bcl-2 Conversion Gene by PHB-PDMAEMA Amphiphilic Cationic Copolymer for Effective Drug Resistant Cancer Therapy. *Macromol Biosci.* 2017a; 17(11): 1700186.

Wang Y, Zhang R, Xu N, Du FS, Wang YL, Tan YX, *et al.* Reduction-Degradable Linear Cationic Polymers as Gene Carriers Prepared by Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition. *Biomacromolecules.* 2011; 12(1): 66-74.

Wang YP, Wang LN, Li B, Cheng YX, Zhou DF, Chen X, *et al.* Compact Vesicles Self-Assembled from Binary Graft Copolymers with High Hydrophilic Fraction for Potential Drug/Protein Delivery. *ACS Macro Lett.* 2017b; 6(11): 1186-1190.

Wei H, Zhuo RX, Zhang XZ. Design and development of polymeric micelles with cleavable links for intracellular drug delivery. *Prog Polym Sci.* 2013; 38(3-4): 503–535.

Wiggins LF. The acetone derivatives of hexahydric alcohols. 1. Triacetone mannitol and its conversion into D-arabinose. *J Chem Soc.* 1946; 13-14.

Xu FJ, Yang WT. Polymer vectors via controlled/living radical polymerization for gene delivery. *Prog Polym Sci.* 2011; 36(9): 1099-1131.

Yang D, Chen W, Hu J. Design of controlled drug delivery system based on disulfide cleavage trigger. *J Phys Chem B.* 2014; 118(43): 12311–12317.

Yang J, Duan Y, Zhang X, Wang Y, Yu A. Modulating the cellular microenvironment with disulfide-containing nanoparticles as an auxiliary cancer treatment strategy. *J Mater Chem B.* 2016; 4(22): 3868-3873.

Zhang CH, Wen XJ, Vyavahara NR, Boland T. Synthesis and characterization of biodegradable elastomeric polyurethane scaffolds fabricated by the inkjet technique. *Biomaterials*. 2008; 29(28): 3781–3791.

Zhang P, Zhang H, He W, Zhao D, Song A, Luan Y. Disulfide-Linked Amphiphilic Polymer-Docetaxel Conjugates Assembled Redox-Sensitive Micelles for Efficient Antitumor Drug Delivery. *Biomacromolecules*. 2016; 17(5): 1621-1632.

Zhang Y, Chan HF, Leong KW. Advanced materials and processing for drug delivery: The past and the future. *Adv Drug Deliver Rev*. 2013; 65(1): 104-120.

Zhao QQ, Chen JL, Lv TF, He CX, Tang GP, Liang WQ, *et al*. N/P Ratio Significantly Influences the Transfection Efficiency and Cytotoxicity of a Polyethylenimine/Chitosan/DNA Complex. *Biol Pharm Bull*. 2009; 32(4): 706–710.



References for Chapter 5

Blackman LD, Doncom KEB, Gibson MI, O'Reilly RK. Comparison of photo-and thermally initiated polymerization-induced self-assembly: a lack of end group fidelity drives the formation of higher order morphologies. *Polym Chem.* 2017; 8(18): 2860-2871.

Blanazs A, Armes SP, Ryan AJ. Self-Assembled Block Copolymer Aggregates: From Micelles to Vesicles and their Biological Applications. *Macromolecular Rapid Communications.* 2009; 30(4-5): 267-277.

Blanazs A, Madsen J, Battaglia G, Ryan AJ, Armes SP. Mechanistic Insights for Block Copolymer Morphologies: How Do Worms Form Vesicles?. *J Am Chem Soc.* 2011; 133(41): 16581-16587.

Blanazs A, Ryan AJ, Armes SP. Predictive Phase Diagrams for RAFT Aqueous Dispersion Polymerization: Effect of Block Copolymer Composition, Molecular Weight, and Copolymer Concentration. *Macromolecules.* 2012a; 45(12): 5099-5107.

Blanazs A, Verber R, Mykhaylyk OO, Ryan AJ, Heath JZ, Douglas CWI, *et al.* Sterilizable Gels from Thermoresponsive Block Copolymer Worms. *J Am Chem Soc.* 2012b; 134(23): 9741-9748.

Braunecker WA, Matyjaszewski K. Controlled/living radical polymerization: Features, developments, and perspectives. *Prog Polym Sci.* 2007; 32(1): 93-146.

Canning SL, Smith GN, Armes SP. A Critical Appraisal of RAFT-Mediated Polymerization-Induced Self Assembly. *Macromolecules.* 2016; 49(6): 1985-2001.

Canton I, Warren NJ, Chahal A, Amps K, Wood A, Weightman R, *et al.* Mucin-Inspired Thermoresponsive Synthetic Hydrogels Induce Stasis in Human

Pluripotent Stem Cells and Human Embryos. ACS Central Science. 2016; 2(2): 65-74.

Charleux B, Delaittre G, Rieger J, D'Agosto F. Polymerization-induced self-assembly: From soluble macromolecules to block copolymer nano-objects in one step. Macromolecules. 2012; 45(17): 6753-6765.

Chiefari J, Chong YK, Ercole F, Krstina J, Jeffery J, Le TPT, *et al.* Living free-radical polymerization by reversible addition-fragmentation chain transfer: The RAFT process. Macromolecules. 1998; 31(16): 5559-5562.

Cunningham VJ, Ratcliffe LPD, Blanz A, Warren NJ, Smith AJ, Mykhaylyk OO, *et al.* Tuning the critical gelation temperature of thermo-responsive diblock copolymer worm gels. Polym Chem. 2014; 5(21): 6307-6317.

Derry MJ, Fielding LA, Armes SP. Polymerization-induced self-assembly of block copolymer nanoparticles via RAFT non-aqueous dispersion polymerization. Prog Polym Sci. 2016; 52: 1-18.

Engelis NG, Anastasaki A, Nurumbetov G, Truong NP, Nikolaou V, Shegiwal A, *et al.* Sequence-controlled methacrylic multiblock copolymers via sulfur-free RAFT emulsion polymerization. Nat Chem. 2017; 9(2): 171-178.

Figg CA, Simula A, Gebre KA, Tucker BS, Haddleton DM, Sumerlin BS. Polymerization-induced thermal self-assembly (PITSA). Chem Sci. 2015; 6(2): 1230-1236.

Gonzato C, Semsarilar M, Jones ER, Li F, Krooshof GJP, Wyman P, *et al.* Rational Synthesis of Low-Polydispersity Block Copolymer Vesicles in Concentrated Solution via Polymerization-Induced Self-Assembly. J Am Chem Soc. 2014; 136(31): 11100-11106.

Gutowska A, Jeong B, Jasionowski M. Injectable gels for tissue engineering. *Anat Record*. 2001; 263(4): 342-349.

Keddie DJ, Moad G, Rizzardo E, Thang SH. RAFT Agent Design and Synthesis. *Macromolecules*. 2012; 45(13): 5321-5342.

Kocik MK, Mykhaylyk OO, Armes SP. Aqueous worm gels can be reconstituted from freeze-dried diblock copolymer powder. *Soft Matter*. 2014; 10(22): 3984-3992.

Ladmiral V, Semsarilar M, Canton I, Armes SP. Polymerization-Induced Self-Assembly of Galactose-Functionalized Biocompatible Diblock Copolymers for Intracellular Delivery. *J Am Chem Soc*. 2013, 135(36): 13574-13581.

Lowe AB, McCormick CL. Reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) radical polymerization and the synthesis of water-soluble (co)polymers under homogeneous conditions in organic and aqueous media. *Prog Polym Sci*. 2007; 32(3): 283-351.

Ma YH, Tang YQ, Billingham NC, Armes SP, Lewis AL. Synthesis of biocompatible, stimuli-responsive, physical gels based on ABA triblock copolymers. *Biomacromolecules*. 2003; 4(4): 864-868.

Madsen J, Armes SP, Lewis AL. Preparation and aqueous solution properties of new thermoresponsive biocompatible ABA triblock copolymer gelators. *Macromolecules*. 2006; 39(22): 7455-7457.

Mitchell DE, Lovett JR, Armes SP, Gibson MI. Combining Biomimetic Block Copolymer Worms with an Ice-Inhibiting Polymer for the Solvent-Free Cryopreservation of Red Blood Cells. *ANGEW Chem Int Edit*. 2016; 55(8): 2801-2804.

Moad G, Rizzardo E, Thang SH. Living Radical Polymerization by the RAFT Process - A Second Update. *Aust J Chem.* 2009; 62(11): 1402-1472.

Moad G, Rizzardo E, Thang SH. Living Radical Polymerization by the RAFT Process - A Third Update. *Aust J Chem.* 2012; 65(8): 985-1076.

Moad G, Rizzardo E, Thang SH. Living radical Polymerization by the RAFT process. *Aust J Chem.* 2005; 58(6): 379-410.

Moad G, Solomon DH. *The Chemistry of Radical Polymerization.* 2nd Edn. Boston: Elsevier; 2006.

Moad G. RAFT polymerization to form stimuli-responsive polymers. *Polym Chem.* 2017; 8(1): 177- 219.

Nagarajan R. Molecular packing parameter and surfactant self-assembly: The neglected role of the surfactant tail. *Langmuir.* 2002; 18(1): 31-38.

Odian G. *Principles of Polymerization.* 4th Edn. Staten Island, New York: John Wiley and Sons, Inc.; 2004.

Pei YW, Lowe AB. Polymerization-induced self-assembly: Ethanolic RAFT dispersion polymerization of 2-phenylethyl methacrylate. *Polym Chem.* 2014; 5(7): 2342-2351.

Penfold NJW, Lovett JR, Verstraete P, Smets J, Armes SP. Stimulus-responsive non-ionic diblock copolymers: protonation of a tertiary amine end-group induces vesicle-to-worm or vesicle-to-sphere transitions. *Polym Chem.* 2017a; 8(1): 272-282.

Penfold NJW, Lovett JR, Warren NJ, Verstraete P, Smets J, Armes SP. pH-Responsive non-ionic diblock copolymers: protonation of a morpholine end-group induces an order-order transition. *Polym Chem.* 2016a; 7(1): 79-88.

Penfold NJW, Ning Y, Verstraete P, Smets J, Armes SP. Cross-linked cationic diblock copolymer worms are superflocculants for micrometer-sized silica particles. *Chem Sci.* 2016b; 7(12): 6894-6904.

Penfold NJW, Parnell AJ, Molina M, Verstraete P, Smets J, Armes SP. Layer-By-Layer Self-Assembly of Polyelectrolytic Block Copolymer Worms on a Planar Substrate. *Langmuir.* 2017b; 33(50): 14425-14436.

Perrier S. 50th Anniversary Perspective: RAFT Polymerization-A User Guide. *Macromolecules.* 2017; 50(19): 7433-7447.

Ratcliffe LPD, Ryan AJ, Armes SP. From a Water-Immiscible Monomer to Block Copolymer Nano-Objects via a One-Pot RAFT Aqueous Dispersion Polymerization Formulation. *Macromolecules.* 2013; 46(3): 769-777.

Ren K, Perez-Mercader J. Thermoresponsive gels directly obtained via visible light-mediated polymerization-induced self-assembly with oxygen tolerance. *Polym Chem.* 2017; 8(23): 3548-3552.

Rymaruk MJ, Thompson KL, Derry MJ, Warren NJ, Ratcliffe LPD, Williams CN, *et al.* Bespoke contrast-matched diblock copolymer nanoparticles enable the rational design of highly transparent Pickering double emulsions. *Nanoscale.* 2016; 8(30): 14497-14506.

Schilli CM, Zhang MF, Rizzardo E, Thang SH, Chong YK, Edwards K, *et al.* A new double-responsive block copolymer synthesized via RAFT polymerization: Poly(N-isopropylacrylamide)-block-poly(acrylic acid). *Macromolecules.* 2004; 37(21): 7861-7866.

Sciannamea V, Jerome R, Detrembleur C. In-situ nitroxide-mediated radical polymerization (NMP) processes: Their understanding and optimization. *Chem Rev.* 2008; 108(3): 1104-1126.

Semsarilar M, Ladmiral V, Blanazs A, Armes SP. Cationic Polyelectrolyte-Stabilized Nanoparticles via RAFT Aqueous Dispersion Polymerization. *Langmuir*, 2013, 29(24): 7416-7424.

Tan JB, Liu DD, Bai YH, Huang CD, Li XL, He J, *et al.* An insight into aqueous photoinitiated polymerization-induced self-assembly (photo-PISA) for the preparation of diblock copolymer nano-objects. *Polym Chem.* 2017; 8(8): 1315-1327.

Turecek PL, Bossard MJ, Schoetens F, Ivens IA. PEGylation of Biopharmaceuticals: A Review of Chemistry and Nonclinical Safety Information of Approved Drugs. *J Pharm Sci.* 2016. 105(2): 460-475.

Verber R, Blanazs A, Armes SP. Rheological studies of thermo-responsive diblock copolymer worm gels. *Soft Matter.* 2012; 8(38): 9915-9922.

Warren NJ, Armes SP. Polymerization-Induced Self-Assembly of Block Copolymer Nano-objects via RAFT Aqueous Dispersion Polymerization. *J Am Chem Soc.* 2014; 136(29): 10174-10185.

Warren NJ, Mykhaylyk OO, Mahmood D, Ryan AJ, Armes SP. RAFT Aqueous Dispersion Polymerization Yields Poly(ethylene glycol)-Based Diblock Copolymer Nano-Objects with Predictable Single Phase Morphologies. *J Am Chem Soc.* 2014, 136(3): 1023-1033.

Williams M, Penfold NJW, Armes SP. Cationic and reactive primary amine-stabilised nanoparticles via RAFT aqueous dispersion polymerisation. *Polym Chem.* 2016b; 7(2): 384-393.

Williams M, Penfold NJW, Lovett JR, Warren NJ, Douglas CWI, Doroshenko N, *et al.* Bespoke cationic nano-objects via RAFT aqueous dispersion polymerisation. *Polym Chem.* 2016a; 7(23): 3864-3873.

Woodcock JW, Wright RAE, Jiang XG, O'Lenick TG, Zhao B. Dually responsive aqueous gels from thermo- and light-sensitive hydrophilic ABA triblock copolymers. *Soft Matter.* 2010; 6(14): 3325-3336.

Zetterlund PB, Thickett SC, Perrier S, Bourgeat-Lami E, Lansalot M. Controlled/Living Radical Polymerization in Dispersed Systems: An Update. *Chem Rev.* 2015; 115(18): 9745–9800.

Zhang CL, Miao M, Cao XT, An ZS. One-pot RAFT synthesis of core cross-linked star polymers of polyPEGMA in water by sequential homogeneous and heterogeneous polymerizations. *Polym Chem.* 2012; 3(9): 2656-2664.



Anexos:

Abreviaturas y acrónimos

Apéndice de espectros

δ	Desplazamiento químico
λ	Longitud de onda
ν	Número de onda
ζ	Zeta potential
ΔH_c	Entalpía de cristalización
ΔH_m	Entalpía de fusión
ΔW	Pérdida de peso
^{13}C RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13
^1H RMN	Resonancia Magnética Nuclear de protón
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR	Experimentos de correlación heteronuclear (HETCOR ^1H - ^{13}C)
AAC	Cicloadición azida alquino
ACVA	4,4'-azobis(4-cyanovaleric acid)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIBA	2,2'-Azobis(2- methylpropionamidine) dihydrochloride
AIBN	2,2'-Azobisisobutironitrilo
ARN	Ácido ribonucleico
ATRP	Atom transfer radical polymerisation
Boc	<i>Terc</i> -butiloxicarbonilo
bs	Broad singlet
Bz	Benzoilo
c	Cuartete
c.c.f.	Cromatografía en capa fina
CI	Chemical Ionization
CMC	concentración micelar crítica
CoPU	Copoliuretano
COSY	Correlated Spectroscopy/Experimentos de correlación homonuclear
CTA	Chain transfer agent
CuAAC	Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition

d	Doblete
DC	Direct compression
DCC	<i>N,N'</i> -dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Dichloromethane
dd	Doble doblete
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DLS	Dynamic light scattering
DMA	<i>N,N</i> -Dimetilacetamida
DMAP	4-(dimethylamino)pyridine
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DNA	Deoxyribonucleic acid
DP	Degree of polymerisation
DPL	2,2'-dithiodiethanol dipropiolate
DPN	dipropargyl 3,3'-dithiodipropionate
DSC	Differential Scanning Calorimetry
DTT	Ditiotreitol
EA	Ethyl acetate
EB	Ethyl bromide
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
EI	Ionización química
eq.	Equivalente(s)
ESI-MS	Electrospray ionization mass spectrometry
Et ₂ O	Diethyl ether
EtOAc	Acetate of ethyl
EtOH	Ethanol
FDA	Food and Drug Administration
FTIR-ATR	Fourier transform infrared- Attenuated total reflectance

G	PGMA
GI	Gastrointestinal
GPC	Cromatografía de permeación en gel
GSH	Glutamilcisteinilglicina (glutación en su forma reducida)
GSSG	Glutación en su forma oxidada
h	Hora(s) – Hour(s)
H	PHPMA
hESCs	Células madre embrionarias humanas
HETCOR	Experimentos de correlación heteronuclear
HFEA	Huma Fertilization and Embryology Authority
HMDI	Hexametilendisocianato
homoPU	Homopoliuretano
HPMA	2-hydroxyethyl methacrylate
hPSCs	Human pluripotent stem cells
HRFABMS	High resolution fast-atom bombardment mass spectrometry
HR-MAS	High resolution magic angle spinning
HRMS	Espectroscopía de masas de alta resolución
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Correlation
Hz	Hertzios
ICS	Inmunosuficiencia combinada severa
IR	Infrarrojos
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
J	Julios
LRP	living radical polymerisation
m	Multiplete
MeOD	Metanol deuterado
MeOH	Metanol
MHz	Mega Hertzios
min	Minuto/s

M_n	Number-average Molecular Weight
mPEG	Polietilenglicol monometilado
MTS	(E,Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazano (formazano del MTT)
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (sal de tetrazolio)
M_w	Weight-average Molecular Weight
MWDs	Molecular weight distributions
nm	nanometros
NMP	nitroxide addition-fragmentation
P	Precipitate
p.f.	Punto de fusión
PCL	policaprolactona
PDI	polydispersity index
PDMAEMA	poli[metacrilato de 2-(dimetilamino)etilo]
PEG	Polyethylene glycol
pEGFP	Enhanced green fluorescent protein plasmid
PEI	Poli(etilenimina)
PETTC	4-cyano-4-(2-phenylethanesulfanyl-thiocarbonyl)sulfanyl-pentanoic acid
PGAA	Poliglicoamidoamina
PGMA	Poly(glycerol monomethacrylate)
Ph	Fenilo
PHPMA	Poly(2-hydroxyethyl methacrylate)
PISA	polymerisation- induced self-assembly
PLL	poli-L-lisina
PMMA	poly(methyl methacrylate)
ppm	Partes por millón
PSM	Polimersoma/s

PT	Politriazol/es
PTFE	Politetrafluoroetileno
PU	Poliuretano/s
py	Piridina
RAFT	Reversible Addition–Fragmentation chain Transfer)
ram.	Ramificación
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
Rto.	Rendimiento
S	Spheres
s	Singulete
sa	Singulete ancho
SEM	Scanning Electron Microscopy
SLC	Sistemas de Liberación Controlada
STEM	Scanning Transmission Electron Microscopy
t	Triplete
T	Temperatura
t.a.	Temperatura ambiente
TBME	<i>Terc</i> -butil metil éter
^t BuOH	<i>Terc</i> -butanol
T_c	Temperatura de cristalización
T_d	Temperatura de descomposición
T_{ds}	Temperatura de descomposición máxima
TEG	Trietilenglicol
TEM	Transmission Electron Microscopy
TFA	Ácido trifluoroacético
T_g	Temperatura de transición vítrea
TGA	Thermogravimetric Analysis
THF	Tetrahidrofurano

T_m	Melting point
Ton	Tonelada/s
Tr	Tritilo
TsCl	Cloruro de tosilo
UCR	Unidad Constitucional Repetitiva
USAC	Ultrasound-assisted compression
UV/VIS	Ultravioleta-Visible
V	Vesicles
VA-044	2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride
vs.	Versus
W	Worms

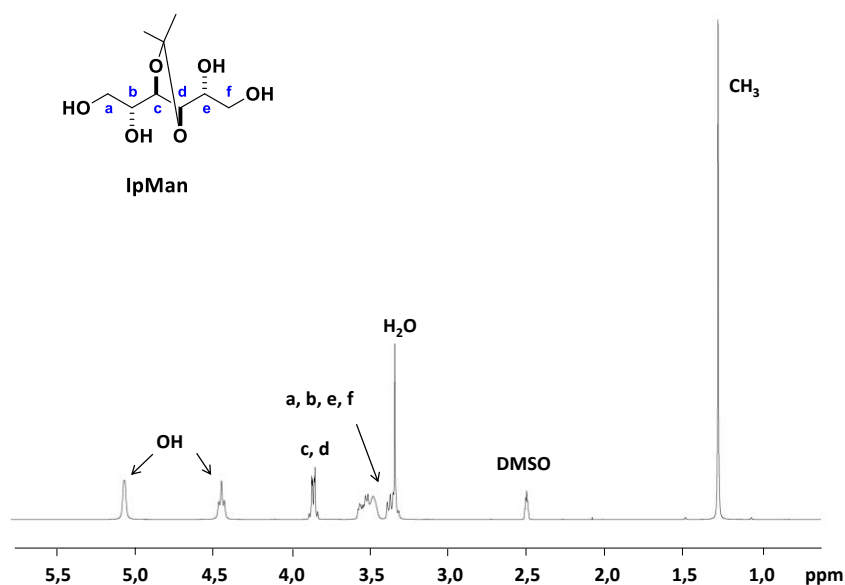


Figura A1. Espectro de ^1H RMN de 3,4-*O*-isopropilidén-D-manitol (IpMan).

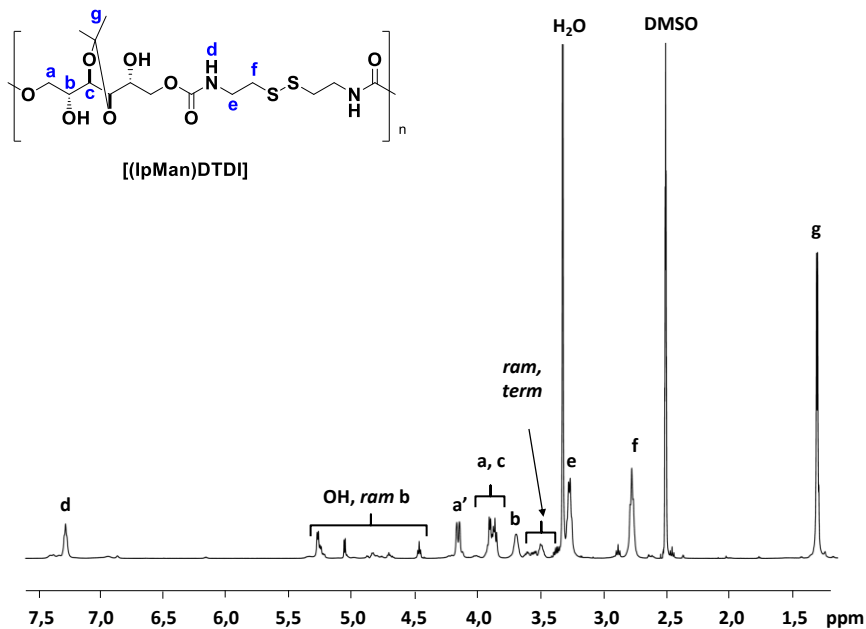


Figura A2. Espectro de ^1H RMN de [(IpMan)DTDI].

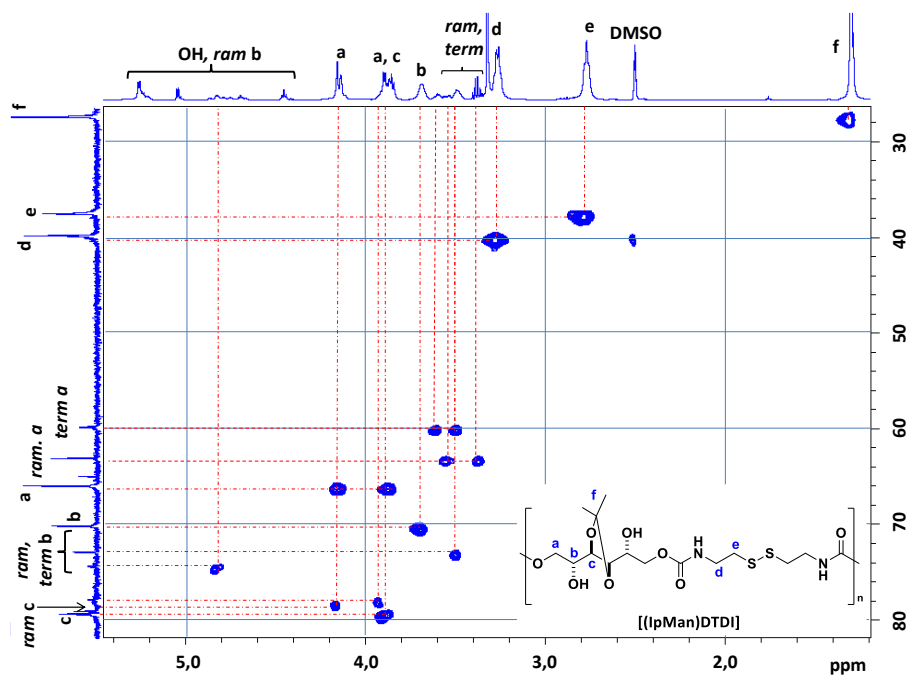


Figura A3. Espectro de $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HETCOR RMN de $[(\text{IpMan})\text{DTDI}]$.

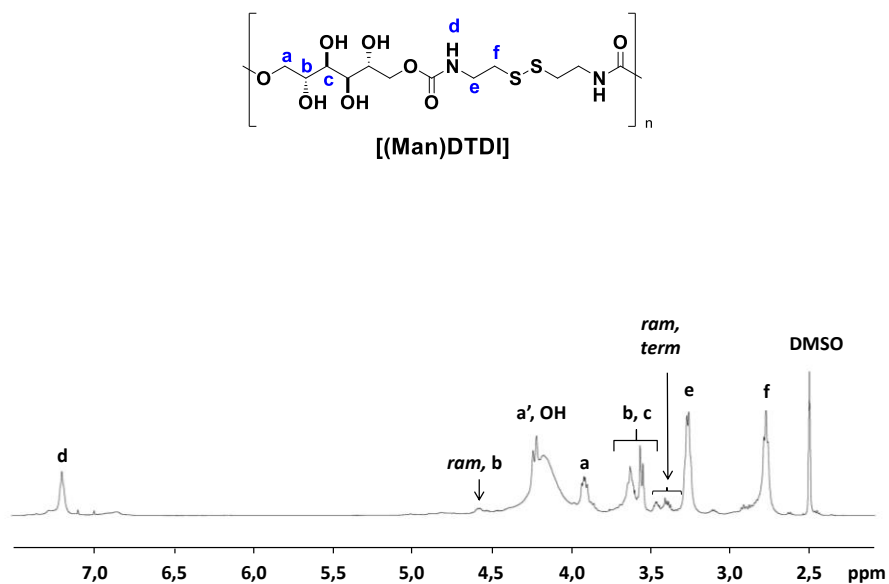


Figura A4. Espectro de ^1H RMN de $[(\text{Man})\text{DTDI}]$.

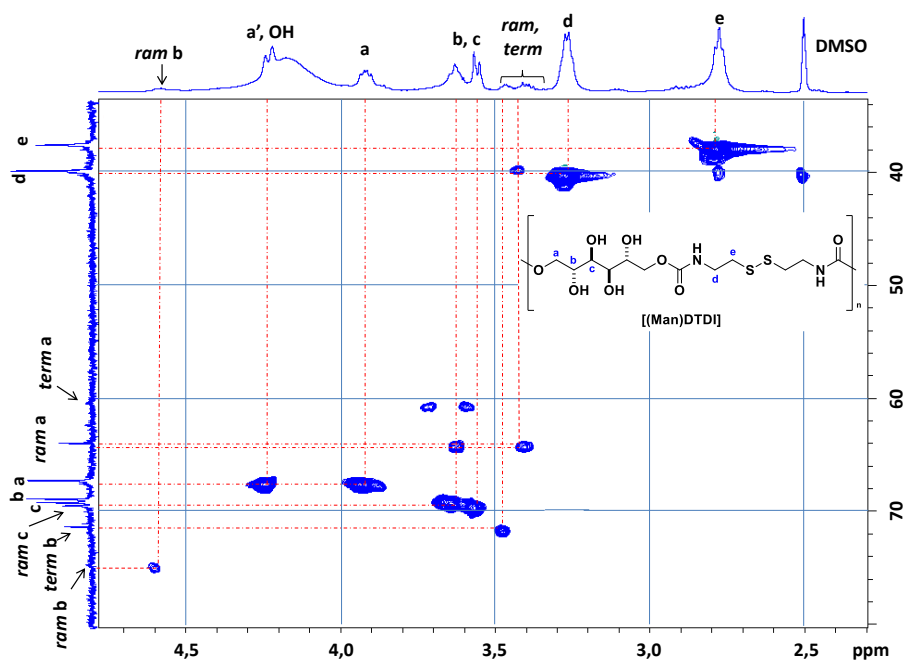


Figura A5. Espectro de $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HETCOR RMN de $[(\text{Man})\text{DTDI}]$.

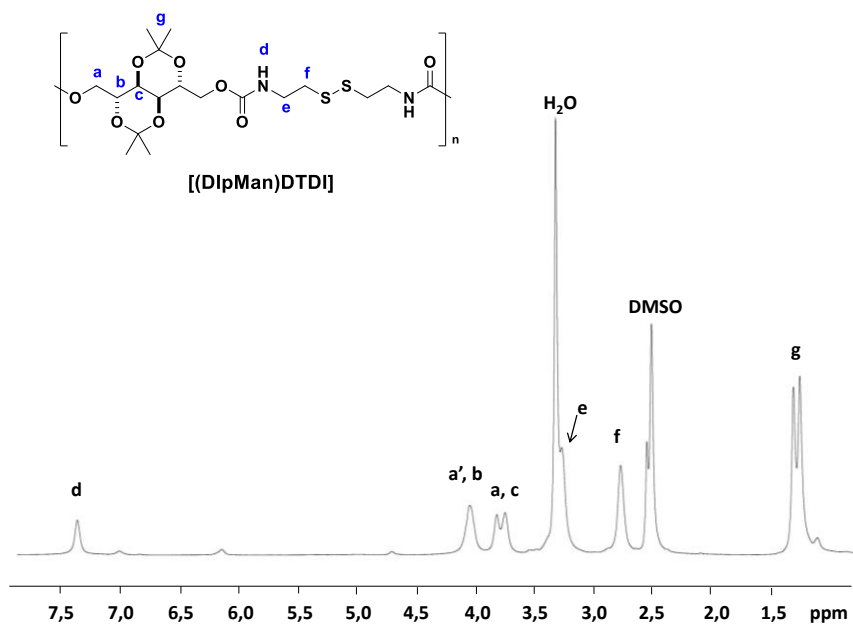


Figura A6. Espectro de ^1H RMN de $[(\text{DipMan})\text{DTDI}]$.

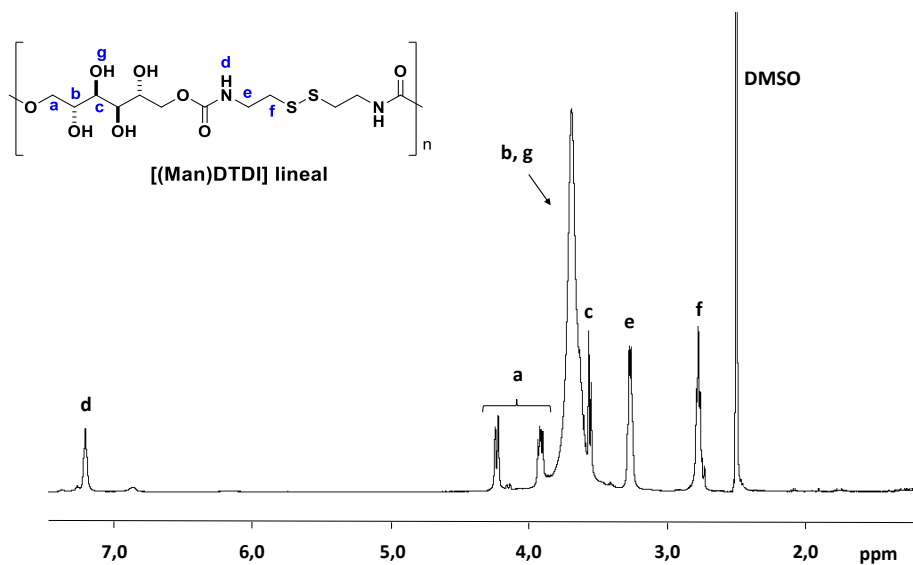


Figura A7. Espectro de ^1H RMN de $[(\text{Man})\text{DTDI}]$ lineal.

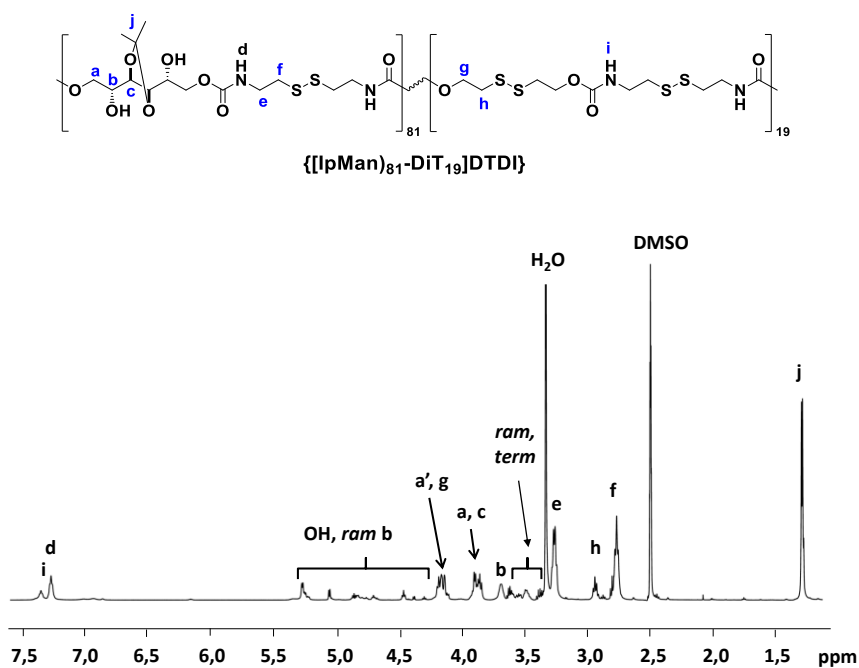


Figura A8. Espectro de ^1H RMN de $\{[\text{IpMan}]_{81}\text{-DiT}_{19}\}\text{DTDI}$.

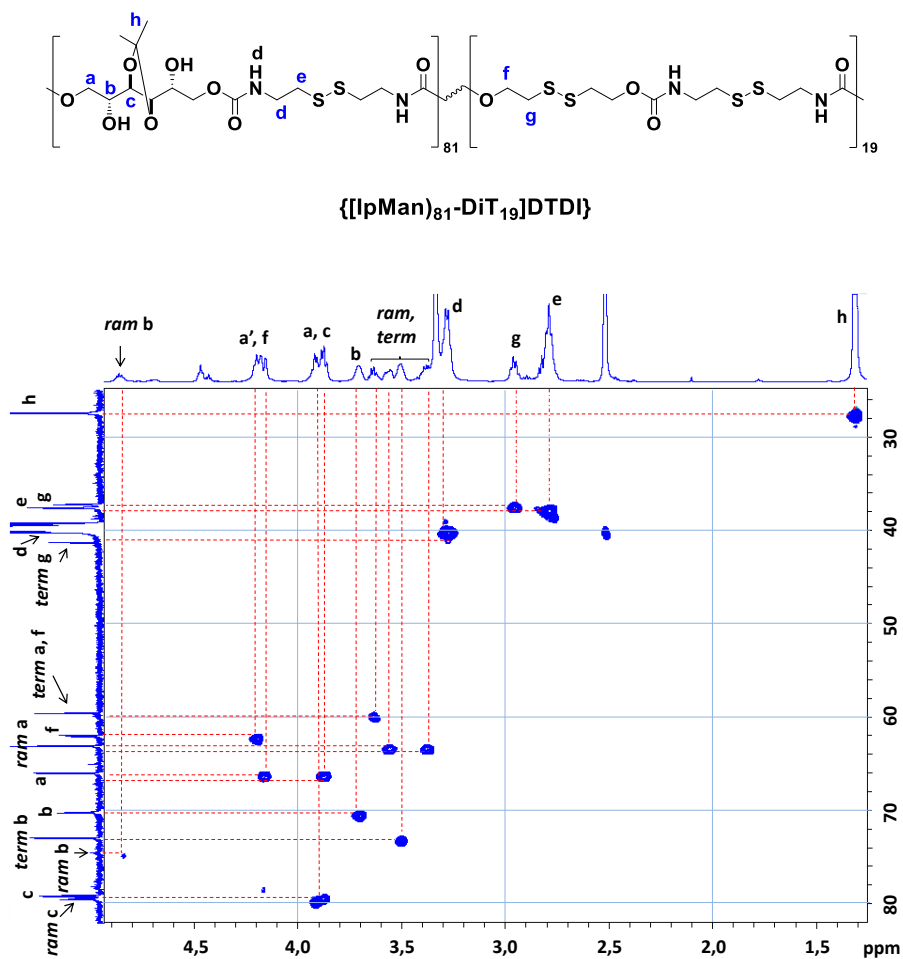


Figura A9. Espectro de $^1H - ^{13}C$ HETCOR RMN de $\{[(IpMan)_{81}-DiT_{19}]DTDI\}$

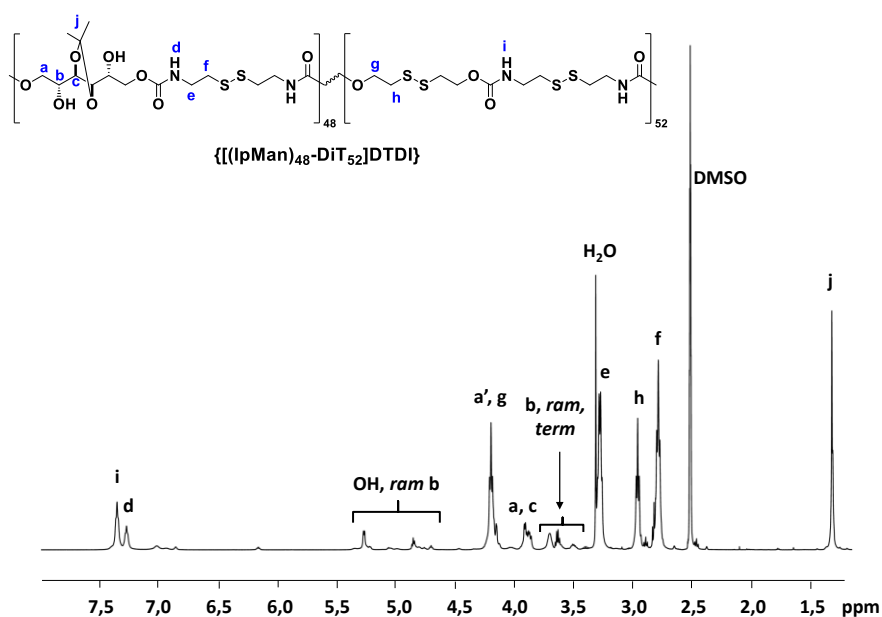


Figura A10. Espectro de 1H RMN de $\{[(IpMan)_{48}-DiT_{52}]DTDI\}$.

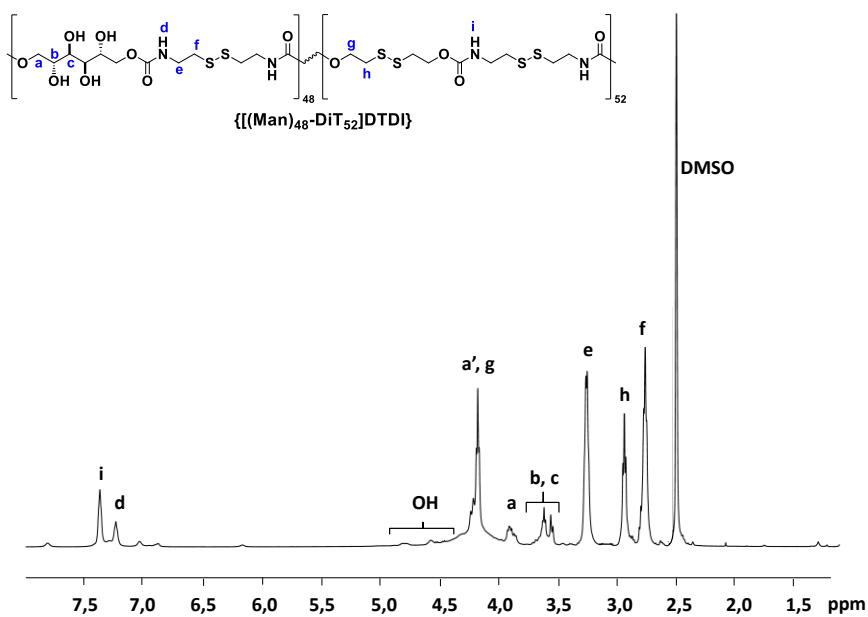


Figura A11. Espectro de 1H RMN de $\{[(Man)_{48}-DiT_{52}]DTDI\}$.

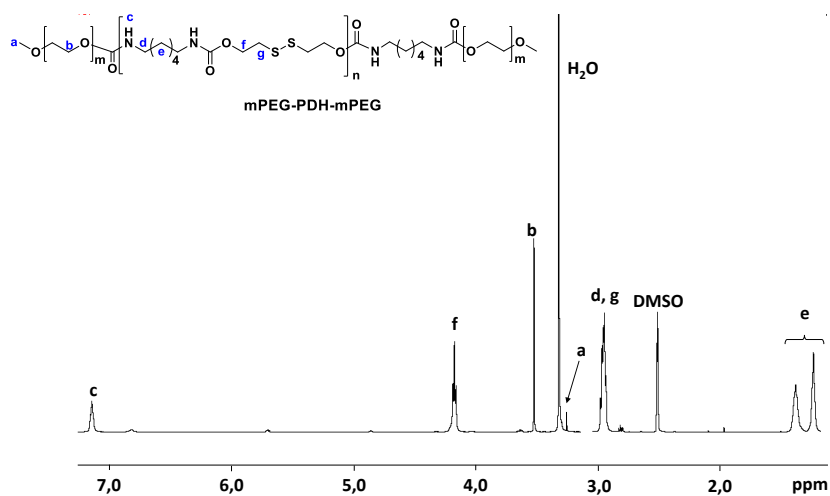


Figura A12. Espectro de ¹H RMN de mPEG-PDH-mPEG.

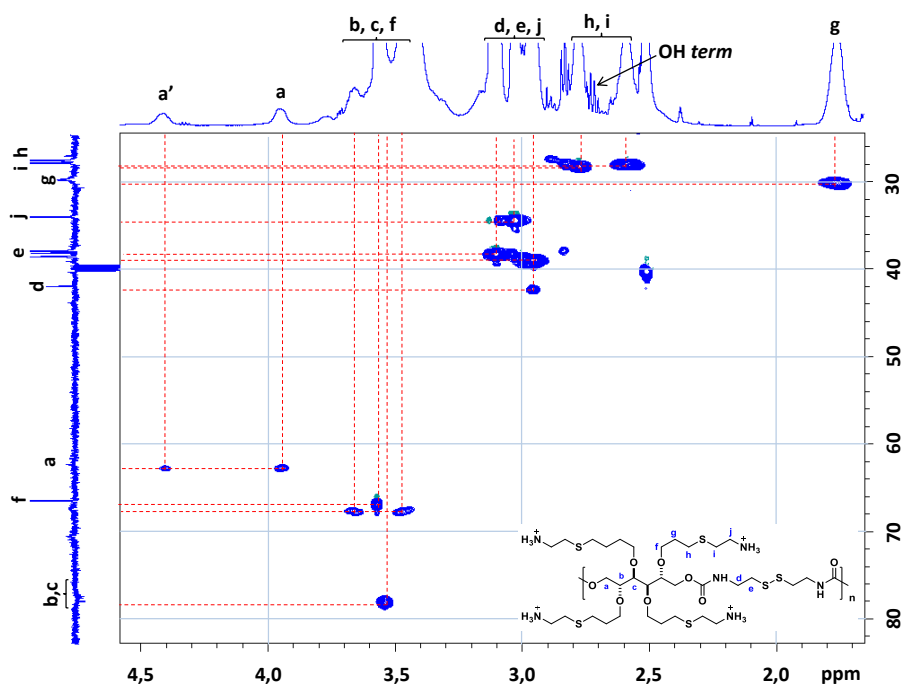


Figura A13. Espectro de ¹H – ¹³C HETCOR RMN de [(MCis)DTDI].

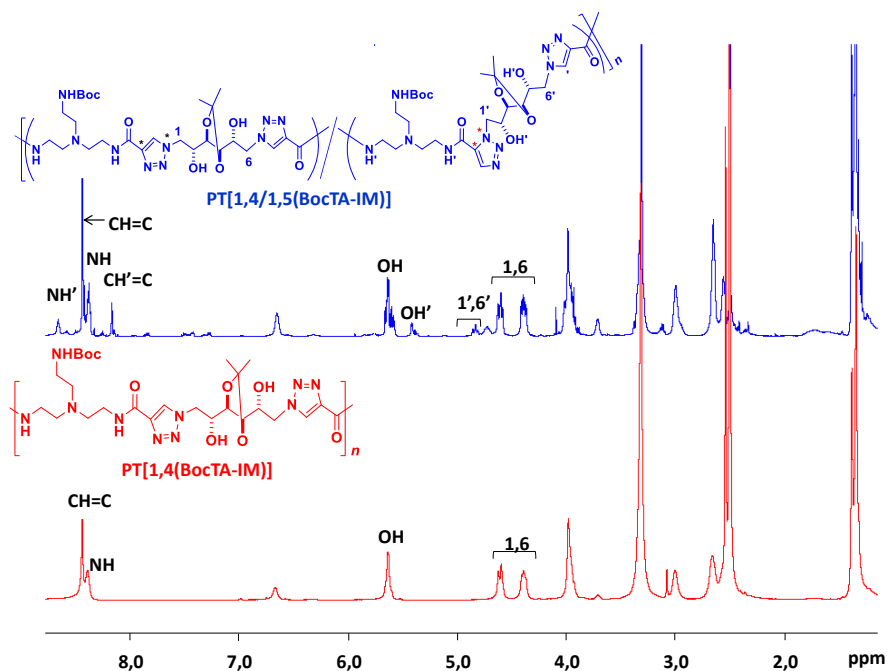


Figura A14. Espectros de ^1H RMN de los PT[1,4/1,5(BocTA-IM)] (azul) y PT[1,4(BocTA-IM)] (rojo).

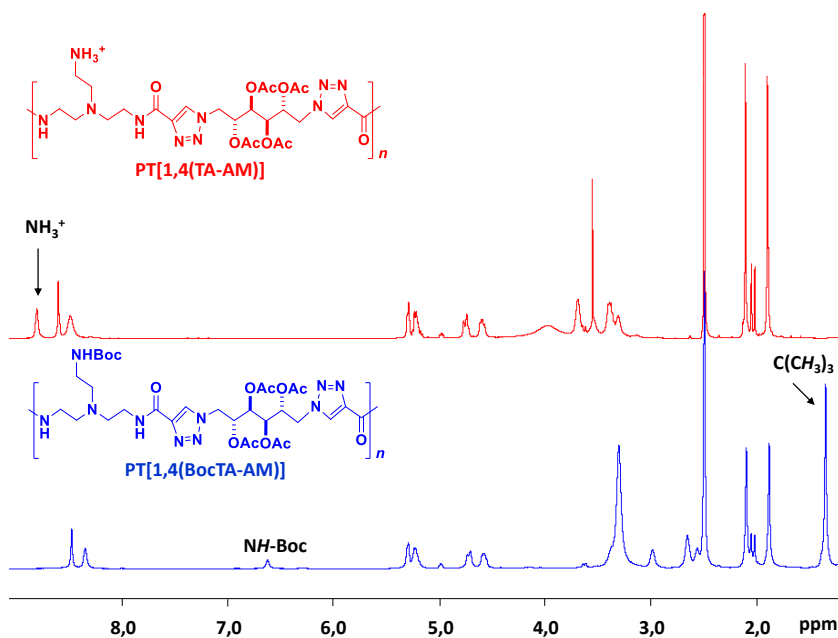


Figura A15. Espectros de ^1H RMN de PT[1,4(BocTA-AM)] y PT[1,4(TA-AM)] (rojo).

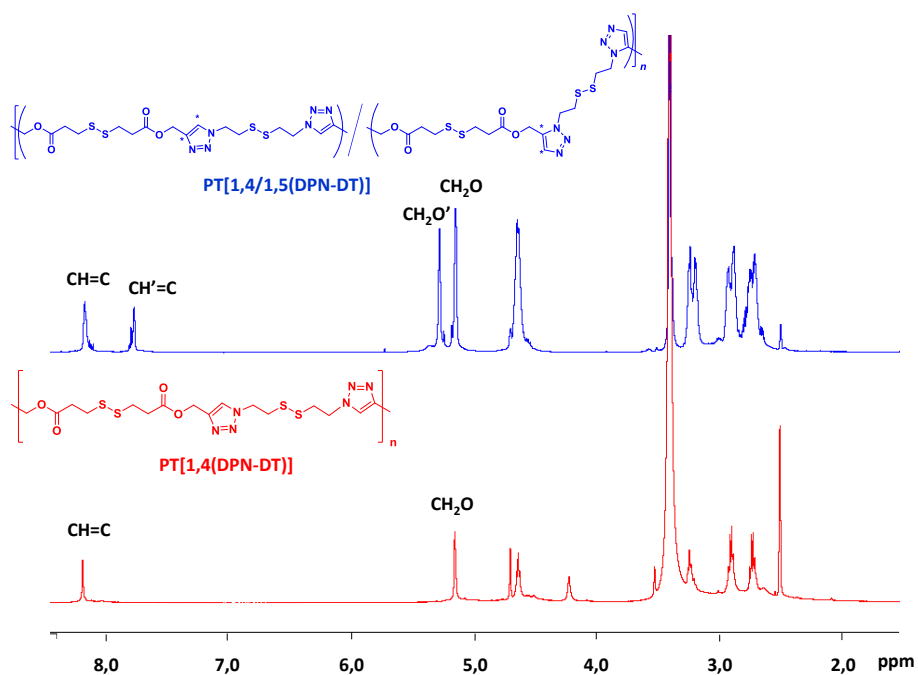


Figura A16. Espectros de ^1H RMN de los PT[1,4/1,5(DPN-DT)] (azul) y PT[1,4(DPN-DT)] (rojo).

